ZELLULÄR-IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI KINDERN MIT IMMUNDEFEKTEN

Angelika Enders

1981

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Betke

ZELLULÄR-IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI KINDERN MIT IMMUNDEFEKTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Enders
aus
München

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. R. EIFE
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. BETKE
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 10. März 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINFÜHRUNG 1

2 MATERIALIEN UND METHODIK 4

2.1 Materialien 5

2.1.1 Präparate und Zubehör 5
2.1.2 Zubereitung bestimmter Präparate 6
2.1.3 Geräte 7

2.2 Methodik 8

2.2.1 Patienten und Kontrollpersonen 8
2.2.2 Lymphozyten-Stimulation 9
2.2.3 Blastentransformation 10
2.2.4 Lymphotoxin-Nachweis 11
2.2.5 Auswertung der Ergebnisse 12

3 EXPERIMENTELLE VORUNTERSUCHUNGEN 14

3.1 Untersuchungen zur Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse 15

3.1.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wiederholter Lymphozyten-Funktionsuntersuchungen 16
3.1.2 Reproduzierbarkeit von Lymphotoxin-Aktivitätsbestimmungen 24

3.2 Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten 26

4 KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN 34

4.1 Definierte Immundefekte 36

4.1.1 Infantile X-chromosomale Agammaglobulinämie 36
4.1.2 Selektiver IgA-Mangel 38
4.1.3 X-chromosomal vererbte Immundefizienz mit Hyper-IgM 40
4.1.4 Konnatale Thymushypoplasie (DiGeorge Syndrom) 42
4.1.5 Ataxia teleangiectatica 43
4.1.6 Wiskott-Aldrich-Syndrom 45
4.1.7 Schwere kombinierte Immundefizienz 56

4.2 Nicht klassifizierte Immundefekte 66

4.2.1 "Isolierter Lymphotoxin-Mangel" 66
4.2.2 Intestinale Lymphangiectasie 68
4.2.3 Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) 71

5 DISKUSSION 76

6 ZUSAMMENFASSUNG 85

7 LITERATURVERZEICHNIS 87

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0033

1 Einführung

Eines der wichtigsten Studienobjekte der Immunologie ist der Lymphozyt. Lymphozyten sind nicht - wie lange angenommen wurde - eine homogene Gruppe von Zellen; grob lassen sich vielmehr zwei funktionell differente Populationen von Lymphozyten unterscheiden: die "T"- und "B"-Zellen.

Die "B"-Zellen, Träger der humoralen Immunität, sind zur Synthese und Abgabe von löslichen Antikörpern fähig. Das Zentralorgan des "B-Zell-Systems" beim Huhn ist die Bursa Fabricii. Beim Säuger ist es bisher nicht bekannt, diskutiert werden Darm-assoziierte Gewebe wie die Tonsillen, Appendix oder Payerschen Plaques, die Leber oder das Knochenmark.

Die vom Thymus abstammenden "T"-Zellen sind Träger der zellvermittelten Immunität, die sich in Reaktionen wie der Abstoßung von Hauttransplantaten oder der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ äußert (bekanntestes Beispiel: Mantoux-Reaktion auf Tuberkulinempfindlichkeit).

Nach Antigenkontakt wandeln sich sensibilisierte Lymphozyten in größere Blasten-ähnliche Zellen um und beginnen sich zu teilen. Ähnliche Veränderungen lassen sich an Lymphozyten durch Pflanzenmitogene induzieren, von denen das bekannteste das Phytohämagglutinin (PHA), ein Extrakt aus der Nierenbohne (Phaseolus vulgaris) ist (NOWELL, 1960).

Diese sog. Blastentransformation von Lymphozyten war Ausgangspunkt für zahlreiche weitere Untersuchungen, um in vitro Methoden zur Bestimmung zellulär-immunologischer Reaktionen zu entwickeln.

Schon bald nach HOWELL's Entdeckung zeigte sich, daß Lymphozyten in vitro nicht nur zur Blastentransformation und Proliferation fähig sind, sondern daß sie auch - ebenfalls als Antwort auf einen Stimulationsreiz - bestimmte, nicht mit Antikörpern verwandte Substanzen, die sog. Lymphokine, bilden und sezernieren können (Übersicht bei LAWRENCE und LANDY, 1969).

Eine dieser Substanzen hat die Eigenschaft, in vitro andere, vorwiegend nicht lymphozytäre Zellen zu zerstören oder deren Wachstum zu hemmen (RUDDLE and WAKSMAN, 1968; GRANGER and KOLB, 1968). Dieses von Lymphozyten sezernierte Toxin wurde von GRANGER "Lymphotoxin" genannt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen haben EIFE und Mitarbeiter eine Mikromethode zum Nachweis des Lymphotoxins im Humansystem entwickelt (EIFE and AUGUST, 1973; EIFE et al., 1974). Dieser Lymphozyten-Funktionstest ermöglicht es, simultan die Lymphozyten-Blastentransformation und die Bildung des Lymphotoxins in vitro zu messen. Er wurde als Mikromethode entwickelt, so daß er mit geringen Mengen von Lymphozyten auskommt und sich somit für die Anwendung in der Kinderklinik besonders anbietet.

Die in den letzten Jahren entwickelten in vitro-Methoden zur Untersuchung zellulärer Immunreaktionen, zu denen auch die Bestimmung der Lymphotoxin-Bildung gehört, haben vor allem aus zwei Gründen in der Klinik besonderes Interesse gefunden:

1. Im Gegensatz zu in vivo-Reaktionen (z.B. den Hauttests vom verzögerten Typ), die nur global (positive oder negative Reaktion) Hinweise auf die immunologische Reaktionsfähigkeit eines Individuums geben, lassen sich durch die in vitro-Untersuchungsmethoden Störungen in den verschiedenen Phasen solcher Reaktionen erkennen.

2. Mit diesen Testverfahren kann man auch dann verläßliche Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Immunkompetenz durchführen, wenn sich in vivo-Untersuchungen verbieten:
   Die in vivo-Untersuchungen der zellulären Immunkompetenz des Menschen sind beschränkt auf Hautreaktionen vom verzögerten (Tuberkulin-) Typ, auf diagnostische allogene Hauttransplantationen zur Bestimmung der Abstoßungszeit und auf die Beobachtung von Impfreaktionen (z.B. die Reaktion auf die Pockenschutzimpfung). Von diesen Untersuchungen sind, wenn eine zelluläre Immundefizienz vermutet wird, nur die Hauttests ohne Risiko für den Patienten durchzuführen.

Es besteht deshalb aus klinischer Sicht ein dringendes Bedürfnis, verläßliche in vitro-Methoden für die Untersuchung und Klassifizierung von Immunstörungen zu entwickeln.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit prüft Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der von LIEF entwickelten Testmethode (Kapitel 3). Anschließend wird im klinischen Teil (Kapitel 4) nach Zusammenhängen zwischen Störungen der Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung und der Art sowie dem Ausmaß bestimmter Immundefizienzen gesucht.

MATERIALIEN UND METHODIK

Materialien und Methodik

2.1 Materialien

2.1.1 Präparate und Zubehör
2.1.2 Zubereitung bestimmter Präparate
2.1.3 Geräte

2.2 Methodik

2.2.1 Patienten und Kontrollpersonen
2.2.2 Lymphozyten-Stimulation
2.2.3 Blastentransformation
2.2.4 Lymphotoxin-Nachweis
2.2.5 Auswertung der Ergebnisse

.1 Materialien

.1.1 Präparate und Zubehör

In den Versuchen wurden folgende Präparate und folgendes Zubehör verwendet:

Medium RPMI 1640 (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Penicillin G (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Streptomycin (GIBCO, Glasgow, Schottland)
Eagle's Minimum Essential Medium (FLOW, Bonn)
fetales Kälberserum (FLOW, Bonn)
Glutamin (FLOW, Bonn)
Trypsin (FLOW, Bonn)
Humanserum (Blutbank des Bayer. Roten Kreuzes, München)
Heparin, 5000 E/ml
(Apotheke der klin. Universitätsanstalten München)
Dextran, 200.000 - 300.000 MG
(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)
Bacto-Phytohämagglutinin-P (DIFCO, Detroit, Michigan)
6-3H-Thymidin, spezifische Aktivität 5 mCi/mM
(Amersham Buchler, Braunschweig)
Trichloressigsäure 5% (Merck, Darmstadt)
Toluol (Merck, Darmstadt)
2,5-Di-phenyloxazol "PPO"
(Koch-Light-Laboratories Ltd,Coinbrocks,Bucks, England)
Polystyrol-Teströhrchen, 12 x 75 mm
(Falcon Plastics, Oxnard, California)
Linbro-Gewebekulturplatten Nr. FB 96-TC (FLOW, Bonn)
HeLa - Zellen der Linie "S 3" (FLOW, Bonn)
Zellulose-Acetat-Membranfilter Nr. SM 111-06025
(Sartorius, Göttingen)
Filterpapier für Skatron (FLOW, Bonn)

2.1.2 Zubereitung bestimmter Präparate

"Kulturmedium 1640" aus Medium RPMI 1640, angereichert mit Humanserum (10%), Glutamin (0,04 mMol/ml), Penicillin G (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), wurde für Leukozytenkulturen verwendet.

"Kulturmedium MEM" aus Minimum Essential Medium, angereichert mit fetalem Kälberserum (10%), Penicillin G (100 E/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) wurde für Indikatorzellkulturen verwendet.

Bacto-Phytohämagglutinin-P (PHA-P) wurde in der Originalflasche mit 5 ml Medium RPMI 1640 gelöst. Von dieser Präparation wurden dann durch weitere Zugabe von Medium RPMI 1640 Serien-Verdünnungen hergestellt, in Polystyrol-Teströhrchen gefüllt und bis zum Gebrauch bei -18°C eingefroren. In der Regel wurden die Verdünnungen 1:40, 1:80 und 1:320 (Endkonzentration pro 1,5 ml-Kultur: 50, 25 und 6,25 µg PHA) zur Lymphozyten-Stimulation verwendet.

Dextran wurde mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer 6 %igen Lösung bereitet.

6-3H-Thymidin wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Präparation nochmals 1:10 verdünnt, und zwar mit Kulturmedium 1640 (für Leukozytenkulturen) oder mit Kulturmedium MEM (für Indikatorzellkulturen).

Der Szintillator wurde aus Toluol unter Zugabe von PPO (5 g/l) hergestellt.

2.1.3 Geräte

Alle Inkubationen wurden durchgeführt bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO_2 und 95% Luft in einem Inkubator der Firma Heraeus, Typ KD 600 K CO_2.

Die Präparation der radioaktiv markierten DNS von Leukozyten/Lymphoblasten auf Zellulose-Acetat-Membranfilter geschah mit Hilfe eines Vielfachfiltriergerätes der Firma Hölzel, München.
Die radioaktiv markierte DNS der Indikatorzellen wurde mit Hilfe eines "multiple cell-culture Harvester" (Skatron AS, Heggtopen, Lierbyen, Norwegen) auf Filterpapier übertragen.

Die Szintillationsspektrometrie wurde mittels eines Flüssigkeits-Szintillations-Zählers der Firma Packard (Modell B 2450) durchgeführt. Dabei wurden die Filterplättchen (mit der präzipitierten, radioaktiv markierten DNS der Lymphozyten, bzw. der Indikatorzellen) zusammen mit 10 ml des Szintillators in Szintillationsröhrchen gefüllt, und die counts pro Minute (cpm) gemessen.

2.2. Methodik

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden beruhen im wesentlichen auf den von EIFE und Mitarbeitern veröffentlichten Angaben (EIFE und AUGUST, 1973; EIFE et al., 1974).
Das Prinzip der Methode besteht darin, daß Lymphozyten in Suspension stimuliert werden und von den auf die Stimulation hin erfolgten Reaktionen gemessen werden:
1. die induzierte Lymphozyten-Blastentransformation
2. die Lymphotoxin-Bildung.
Außerdem wurde die spontane Zellproliferation in den nichtstimulierten Lymphozytenkulturen bestimmt.

2.2.1 Patienten und Kontrollpersonen

Die Studie wurde so durchgeführt, daß bei jedem Lymphozyten-Funktionstest eines Patienten die Lymphozyten einer gesunden Kontrollperson mit untersucht wurden.
Auf diese Weise war es möglich, die Untersuchungsergebnisse jedes Patienten mit denen einer gesunden Kontrollperson zu vergleichen. Dies schien uns besonders wichtig bei Untersuchungsproben, die uns von auswärts zugesandt wurden, um eine eventuell durch Vorschädigung der Zellen, z.B. aufgrund verlängerter Lagerung oder Abkühlung beim Transport, bedingte verminderte Lymphozytenreaktion sicher von einer als pathologisch zu bewertenden unterscheiden zu können.

2.2.2 Lymphozyten-Stimulation

Venöses Blut von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde heparinisiert (0,02 ml Heparin/ml), zur beschleunigten Trennung der Erythrozyten von den Leukozyten mit 6%igem Dextran (1 Teil Dextran auf 4 Teile Blut) gemischt und dann bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Sedimentation der Erythrozyten wurde das Plasma mit den Leukozyten abgehoben und bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Leukozyten-freie Plasma/Dextran-Gemisch wurde verworfen und die im Bodensatz befindlichen Zellen in Medium RPMI 1640 suspendiert, bei 40 g zentrifugiert und je nach Ausgangsvolumen des Blutes in 2 - 5 ml Medium RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden dann gezählt und nach mono- und polynukleären Zellen differenziert.
Durch Zugabe von Kulturmedium 1640 wurde eine Zellsuspension mit $1{,}3 \times 10^5$ mononukleären Zellen (Lymphozyten) pro ml hergestellt und je 1,5 ml dieser Zellsuspension in 12 x 75 mm Kulturröhrchen gegeben. Die so hergestellten Leukozytenkulturen enthielten dann 200.000 Lymphozyten mit einem - je nach Differentialblutbild des Patienten zur Zeit der Blutabnahme - variablen Anteil von Granulozyten.
Die Leukozyten-Kulturen wurden mit 100 ul der PHA-Verdünnungen 1:40, 1:80 und 1:320 (Endkonzentration pro 1,5 ml-Kultur 50 µg, 25 ug und 6,25 ug PHA) stimuliert. Kontroll-Kulturen erhielten 100 µl Medium RPMI 1640 ohne PHA. In der Regel wurden je drei identische Kulturen angesetzt. Die Teströhrchen wurden locker verschlossen und aufrechtstehend für 3 Tage inkubiert.

2.2.3 Blastentransformation

Nach der Inkubation wurden die Leukozyten-Kulturen bei 40 g für 10 Minuten zentrifugiert und je 1,0 ml des zellfreien Mediums abgehoben. Die Überstände von identischen Kulturen wurden gepoolt und bis zur Bestimmung des Lymphotoxin-Gehaltes (s. 2.2.4) bei -18°C eingefroren. Den Rest-Kulturen wurde je 1,0 uCi 3H-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere drei Stunden inkubiert. Die Inkorporation des 3H-Thymidins in die DNS der Zellen wurde durch Abkühlen der Kulturen auf 0°C (im Eisbad) gestoppt und die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung auf Zellulose-Acetat-Membranfilter gewaschen. Die Filter wurden mit Trichloressigsäure und Äthylalkohol gespült, getrocknet und ihre Radioaktivität mittels Szintillationsspektrometrie gemessen.
Die Spontanproliferation in nicht-stimulierten Kulturen wurde nach dem gleichen Verfahren bestimmt.

2.2.4 Lymphotoxin-Nachweis

Als Indikatorzellen für den Nachweis von Lymphotoxin wurden HeLa-Zellen der Linie "S 3" (FLOW, Bonn) benutzt. Die Zellen wurden als Vorratskulturen in 500 ml Flaschen in Kulturmedium MEM als Monolayer-Kulturen gezüchtet und zweimal wöchentlich rekultiviert. Zur Anzüchtung von Indikatorzell-Kulturen wurden aus den Vorratskulturen durch Trypsinieren und kräftiges Pipettieren Einzelzell-Suspensionen hergestellt.

Auf Linbro-Gewebe-Kultur-Platten wurden 100 µl-Kulturen mit 1×10^4 Zellen angesetzt, für 24 Stunden vorinkubiert und dann mit 50 ul der zellfreien Medien der Leukozyten-Kulturen (s.2.2.3) beschickt. Nach einer Inkubation von 45 Stunden wurden den Kulturen je 0,5 uCi 3H-Thymidin (in 50 ul Kulturmedium MEM) zugegeben und die Inkubation für weitere drei Stunden fortgesetzt.

Zur Beendigung der Inkubation wurde das Medium von den Kulturen abgegossen und zum Ablösen der Zellen den Kulturen je 200 ul Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden anschließend mittels eines "Multiple Cell-Culture-Harvester" (SKATRON AS, Heggtopen) mit physiologischer Kochsalz-Lösung auf Filterpapier gewaschen.

Die nach dem Waschen auf den Filtern verbleibende Radioaktivität (3H-Thymidin) wurde mittels Szintillationsspektrometrie bestimmt.

2.2.5 Auswertung der Ergebnisse

Spontane Zellproliferation

In nicht-stimulierten Kulturen von Lymphozyten gesunder Probanden wird nur eine geringe Menge 3H-Thymidin in die DNS der Zellen eingebaut (sog. "Background-3H-Thymidin-Aufnahme"). Nach dreitägiger Inkubation lag bei gesunden Kontrollpersonen diese Background-Aktivität in der Regel unter 1000 cpm.

PHA-induzierte Zellproliferation

Die Counts pro Minute (cpm) in stimulierten Kulturen verglichen mit den cpm der unstimulierten Kulturen dienen als Parameter für die Lymphozyten-Blastentransformation.

In dieser Arbeit wurde die PHA-induzierte Zellproliferation von Patienten-Lymphozyten in Relation zur Zellproliferation der Lymphozyten der jeweiligen Kontrollperson wie folgt bewertet: Eine 3H-Thymidin-Aufnahme (in cpm) in Kulturen mit Leukozyten des Patienten von über 50% der der Kontrollperson wurde als normal, Werte zwischen 10 und 50% als vermindert, Werte zwischen 1 und 10% als stark vermindert bezeichnet. War die PHA-induzierte Proliferation nicht höher als die Spontanproliferation, wurde sie als fehlend beurteilt.

Lymphotoxin-Aktivität

Aus den Counts pro Minute (cpm) in Indikatorzell-Kulturen mit Lymphotoxin-haltigem Medium (cpm_{LT}) und denen in Kulturen ohne Lymphotoxin (Kontrollen = cpm_K) wird die Aktivität des Toxins berechnet und in Prozent Hemmung angegeben:

$$\frac{cpm_K - cpm_{LT}}{cpm_K} \times 100 = \text{Hemmung (in \%)}$$

Im Gegensatz zur PHA-induzierten Zellproliferation lassen sich für die Lymphotoxin-Aktivität Normalwerte angeben.

In dieser Arbeit wurde eine Lymphotoxin-Aktivität, die - nach Stimulation mit 25 µg PHA - zu mehr als 50% Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese führt, als normal, die zu einer Hemmung zwischen 20 und 50% führt, als vermindert, eine solche, die zu weniger als 20% führt, als stark vermindert und eine solche schließlich, die zu keiner Hemmung führt, als fehlend bezeichnet.

In einem Teil der Arbeit wurde versucht, die Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten zu berechnen (s. Abschnitt 3.2).

3 Experimentelle Voruntersuchungen

3.1 Untersuchungen zur Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

3.1.1 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wiederholter Lymphozyten-Funktionsuntersuchungen

3.1.2 Reproduzierbarkeit von Lymphotoxin-Aktivitäts-Bestimmungen

3.2 Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten

3.1
Untersuchungen zur Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Will man aus den Ergebnissen klinischer Testmethoden verläßliche Schlüsse ziehen, muß die Zuverlässigkeit der Methode streng kontrolliert werden.

Jede Messung (Bestimmung der Zellzahl, Volumenmessung durch Pipettieren u.a.) ist in gewissen Grenzen fehlerhaft. Die erreichbare Präzision hängt von der Sorgfalt des Untersuchers, von der Genauigkeit verwendeter Pipetten und Meßgeräte u.a. ab. Im Gegensatz zu diesen zufälligen Fehlern wirken sich systematische Fehler auf die Richtigkeit aller Ergebnisse einer Testserie aus und bewirken Abweichungen in einer Richtung vom "wahren Wert", das heißt alle Ergebnisse einer Testserie liegen fälschlich zu hoch oder zu niedrig. Ursache für systematische Fehler können ungeeignete Seren oder Kulturmedien oder Änderungen in der Empfindlichkeit der Indikatorzellen u.a. sein.
So wird verständlich, daß mit der Komplexität der Testmethode auch die Spanne der Fehlermöglichkeit zunimmt.

Zufällige Fehler versuchten wir durch den Ansatz jeweils dreier identischer Leukozyten- bzw. Indikatorzell-Kulturen in einem relativ engen Rahmen zu halten.

Um systematische Fehlerquellen erfassen zu können, wurden bei jedem Lymphozyten-Funktionstest eines Patienten die Lymphozyten einer gesunden Kontrollperson mit untersucht. Die Bewertung der Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung des Patienten erfolgte jeweils im Vergleich mit dieser Kontrolle.

Die folgenden Untersuchungen sollen den Einfluß systematischer Fehler auf die Untersuchungsergebnisse prüfen.

Tab. 3.1.1/2: Lymphotoxin-Bildung einer in 21 Monaten wiederholt getesteten Kontrollperson

	Indikatorzell-DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) in Gegenwart von Medium aus Leukozytenkulturen			
Test-Nr.	Ø PHA	+PHA 6,25 µg	+PHA 25 µg	+PHA 50 µg
203-298	23463	15886 (-32%)	3879 (-84%)	2083 (-91%)
216-324	16680	12374 (-26%)	3172 (-81%)	2095 (-88%)
291-417	22587	21544 (- 5%)	6472 (-72%)	3473 (-85%)
324-458	10714	6615 (-39%)	2148 (-80%)	1937 (-82%)
342-488	20886	6124 (-71%)	4847 (-77%)	4136 (-80%)
354-517	12111	6804 (-44%)	4930 (-60%)	3817 (-69%)
369-531	7007	3046 (-57%)	2238 (-69%)	2158 (-70%)
387-579	18122	3925 (-78%)	2456 (-87%)	1649 (-91%)
404-596	8553	2541 (-71%)	2227 (-74%)	1411 (-84%)
409-601	13093	3033 (-77%)	3231 (-76%)	2118 (-84%)
425-648	13294	1781 (-87%)	1361 (-90%)	1307 (-91%)
448-720	6290	979 (-85%)	867 (-86%)	958 (-85%)
451-726	4597	921 (-80%)	945 (-79%)	768 (-83%)
453-728	4463	960 (-78%)	1112 (-75%)	955 (-79%)
Mittelwert der Hemmung		59%	78%	83%
Schwankungsbereich		5-87%	60-90%	69-91%

Im Gegensatz zur Blastentransformation liefern die Lymphotoxin-Hemmwerte speziell nach Stimulation mit hohen PHA-Dosen (25 und 50 µg) über einen langen Zeitraum reproduzierbare Ergebnisse. Die hier beschriebenen Daten sind Ergebnisse von Untersuchungen während eines langen Beobachtungszeitraumes. Die z.T. erheblichen Abweichungen von den Mittelwerten können deshalb nicht nur auf zufälligen, sondern auch auf systematischen Fehlern beruhen. So war während der Studie die Zubereitung neuer Lösungen, ein Wechsel der Seren oder Indikatorzellen und die Verwendung neuer Medium-Chargen notwendig (ab Test 387 bis 579 in Tab. 3.1.1/2 wurde z.B. eine neue Indikatorzellinie verwendet). Systematische Fehler müßten also während eines kürzeren Beobachtungszeitraumes geringer sein.

b) "Kurzzeit-Beobachtungen" (Tab. 3.1.1/3 und Abb. 3.1.1)

Um systematische Fehler bei wiederholten Untersuchungen möglichst auszuschließen, wurden die Lymphozyten-Funktionen einer zweiten Kontrollperson in einem Zeitraum von 6 Wochen 10mal untersucht. Da wir alle Änderungen der Kulturbedingungen (Wechsel von Seren, Medium etc.; s.o.) vermieden haben, wäre eine Verminderung der Abweichungen von den Mittelwerten zu erwarten gewesen.
Dies war jedoch nicht der Fall: die cpm-Werte der Blastentransformation lagen in Bereichen zwischen
3.296 und 70.777 cpm (für 6,25 ug PHA),
12.462 und 102.238 cpm (für 25 ug PHA) und
9.042 und 83.783 cpm (für 50 ug PHA).
Die Maximalwerte für alle drei PHA-Dosen wurden in Untersuchung Nr. 6 beobachtet (s. Tab. 3.1.1/3), die Minimalwerte dagegen stammen aus verschiedenen Untersuchungen.

Die Lymphotoxin-Bestimmung ergab auch in dieser Untersuchungsserie eine relative Konstanz der Lymphotoxin-Aktivität (auch bei wiederholter Testung der Lymphotoxin-Präparationen - s. Untersuchungen Nr. 3 bis 10); eine Ausnahme machen nur die Untersuchungen Nr. 5 und 6:

Tab. 3.1.1/3
Lymphozyten-Funktionen einer im Zeitraum von 6 Wochen wiederholt getesteten Kontrollperson

PHA-Stimulans	Blasten-transformation (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme)	Lymphotoxin-Bildung	
1. Untersuchung			
0	146 ± 6	35.219	
6,25 ug	20.105 ± 1622	18.539 (-47%)	
25 ug	12.462 ± 472	11.476 (-67%)	
50 ug	9.042 ± 203	12.646 (-64%)	
2. Untersuchung			
0	190 ± 21	29.316	
6,25 ug	13.595 ± 741	26.838 (- 8%)	
25 ug	27.511 ± 5969	13.463 (-54%)	
50 ug	22.730 ± 1375	9.377 (-68%)	
3. Untersuchung			
0	96 ± 30	29.009	42.348
6,25 ug	3.434 ± 334	27.352 (- 6%)	39.468 (- 7%)
25 ug	21.199 ± 2127	14.214 (-51%)	17.494 (-59%)
50 ug	15.466 ± 356	11.913 (-59%)	14.994 (-65%)
4. Untersuchung			
0	154 ± 20	48.552	37.167
6,25 ug	3.954 ± 277	48.571	34.635 (- 7%)
25 ug	23.328 ± 1553	21.337 (-56%)	17.282 (-54%)
50 ug	16.686 ± 1511	19.498 (-60%)	15.153 (-60%)
5. Untersuchung			
0	129 ± 50	43.412	18.775
6,25 ug	5.570 ± 1199	45.954	17.706 (- 6%)
25 ug	80.360 ± 8214	24.374 (-44%)	12.144 (-35%)
50 ug	47.676 ± 25550	17.208 (-61%)	6.579 (-65%)
6. Untersuchung			
0	380 ± 100	35.755	17.589
6,25 ug	70.777 ± 5629	17.978 (-50%)	8.678 (-51%)
25 ug	102.238 ± 7342	4.216 (-89%)	3.279 (-82%)
50 ug	83.783 ± 2267	4.300 (-88%)	2.396 (-87%)

Tab. 3.1.1/3

Lymphozyten-Funktionen einer im Zeitraum von 6 Wochen wiederholt getesteten Kontrollperson

PHA-Stimulans	Blasten-transformation	Lymphotoxin-Bildung	
	(cpm 3H-Thymidin-Aufnahme)		
7. Untersuchung			
0	298 ± 24	28.446	46.089
6,25 ug	11.007 ± 300	30.658	41.814 (-10%)
25 ug	93.835 ± 5389	10.818 (-62%)	17.144 (-63%)
50 ug	72.235	7.720 (-73%)	12.058 (-74%)
8. Untersuchung			
0	192	55.924	24.576
6,25 ug	3.296	53.822 (- 4%)	24.880
25 ug	17.518 ± 1768	25.404 (-55%)	9.719 (-61%)
50 ug	24.334 ± 2234	16.550 (-70%)	5.789 (-77%)
9. Untersuchung			
0	457 ± 20	30.294	46.162
6,25 ug	40.438 ± 3344	24.952 (-18%)	35.756 (-23%)
25 ug	58.388 ± 7021	13.801 (-54%)	19.887 (-57%)
50 ug	38.276 ± 5508	8.747 (-71%)	14.849 (-68%)
10. Untersuchung			
0	294 ± 22	50.469	38.272
6,25 ug	45.358 ± 1221	36.831 (-28%)	25.739 (-33%)
25 ug	60.059 ± 1914	15.086 (-71%)	15.577 (-60%)
50 ug	33.460 ± 15032	12.739 (-75%)	11.104 (-71%)

Legende: Blastentransformation: die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen bzw. Einzelwerte (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen).

Lymphotoxin-Bildung: die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Indikatorzell-Kulturen).

Mit Ausnahme der Untersuchungen 1 und 2 wurde die Lymphotoxin-Bildung jeweils doppelt bestimmt.

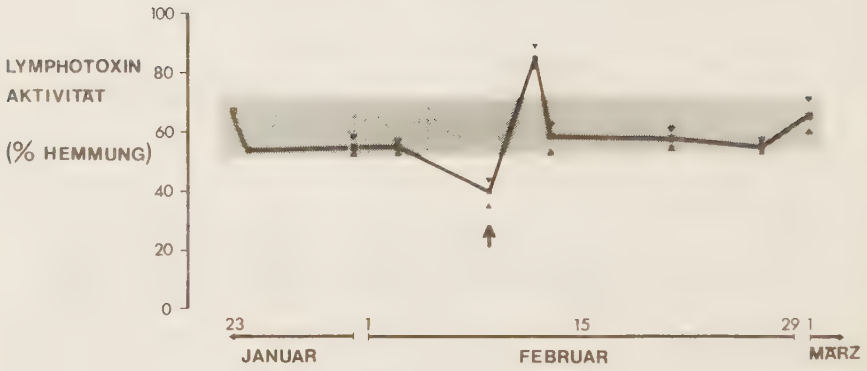


Abb. 3.1.1: Lymphotoxin-Bildung einer im Zeitraum von 6 Wochen wiederholt getesteten Kontrollperson

Ordinate: Lymphotoxin-Aktivität angegeben in Prozent Hemmung der DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) in Indikazell-Kulturen.

Aufgetragen ist die Lymphotoxin-Aktivität nach Stimulation mit PHA in einer Dosis von 25 ug.

Abszisse: Verteilung der Untersuchungen über den Zeitraum von 6 Wochen.

dreieckige Punkte: Lymphotoxin-Aktivität; Werte der in Tab. 3.1.1/3 aufgeführten Lymphotoxin-Bestimmungen; angegeben sind die Mittelwerte von jeweils Dreifachbestimmungen.

viereckige Punkte: Lymphotoxin-Aktivität; Mittelwerte der mit dreieckigen Punkten markierten Doppelbestimmungen.

Pfeil: markiert den zum Zeitpunkt von Untersuchung 5 aufgetretenen Infekt.

Parallel zur deutlich erhöhten Blastentransformation in Untersuchung 6 war auch die Lymphotoxin-Aktivität auffallend hoch. Die Lymphotoxin-Aktivität in der vorhergehenden Untersuchung (Nr. 5)(Abb. 3.1.1 und Tab. 3.1.1/3) zeigt im Gegensatz dazu - für gesunde Probanden - extrem niedrige Werte. Dieser auffällige Befund wird durch eine Änderung der Reaktionslage des Probanden erklärt: zum Zeitpunkt der 5. Untersuchung (s. Pfeil in Abb. 3.1.1) erkrankte der Proband an einem Infekt der oberen Luftwege. Wir nehmen deshalb an, daß die Infektion - also möglicherweise ein veränderter Reaktionsstatus der Kontrollperson selbst - für die Abweichung der Ergebnisse in den beiden Untersuchungen verantwortlich ist.

3.1.2
Reproduzierbarkeit von Lymphotoxin-Aktivitätsbestimmungen

Die Lymphotoxin-Aktivität wird berechnet aus der Hemmwirkung auf die DNS-Synthese von Indikatorzellen (s. 2.2.5), also einen biologischen Test. Änderungen der Empfindlichkeit der Indikatorzellen (bedingt z.B. durch das Altern einer Zelllinie) könnten die Untersuchungsergebnisse beeinflussen und zu falschen Interpretationen führen. Es wurden daher regelmäßig auf den Indikatorzell-Kulturen Lymphotoxin-Präparationen bereits bekannter Lymphotoxin-Aktivität als sog. "Plattenkontrollen" mitgetestet.
Tab. 3.1.2 zeigt die Ergebnisse über einen Zeitraum von 5 Monaten wiederholt getesteter Lymphotoxin-Präparationen.

Es ergaben sich nur geringe Abweichungen bei wiederholten Bestimmungen der Lymphotoxin-Aktivität (maximale Abweichung vom Mittelwert 11%).

Tab. 3.1.2: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wiederholter Lymphotoxin-Aktivitätsbestimmungen

	Indikatorzell-DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) in Gegenwart von Medium aus Leukozytenkulturen			
Test-Nr.	Ø PHA	+PHA 0,25 µg	+PHA 25 µg	+PHA 50 µg
387	35755	17978 (-50%)	4216 (-89%)	4300 (-88%)
413	17589	8678 (-51%)	3279 (-82%)	2396 (-87%)
449	23879	9067 (-62%)	4150 (-83%)	2926 (-88%)
450	22427	9432 (-58%)	3527 (-84%)	2021 (-91%)
452	25664	11874 (-54%)	2365 (-91%)	1048 (-96%)
453	21807	10696 (-51%)	2894 (-87%)	1463 (-93%)
454	27175	16167 (-41%)	4179 (-85%)	3058 (-89%)
455	25976	11754 (-55%)	1972 (-92%)	1185 (-95%)
456	19264	10260 (-47%)	3473 (-82%)	2499 (-88%)
Mittelwert der Hemmung		52%	86%	91%
Schwankungsbereich		41-62%	82-92%	87-96%

3.2
Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten

Bei den Untersuchungen zur Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war wiederholt der breite Schwankungsbereich bei Lymphotoxin-Aktivitätsbestimmungen nach Stimulation mit niedrigen PHA-Dosen (6,25 ug) im Vergleich zu dem Schwankungsbereich nach Stimulation mit höheren PHA-Dosen (25 und 50 ug) aufgefallen (vgl. Tab. 3.1.1/2 und 3.1.1/3).

Ausgehend von dieser Beobachtung versuchten wir nun zu prüfen, ob eine steigende PHA-Stimulation zu keinem weiteren Anstieg des Lymphotoxin-Gehalts in den Präparationen führt oder ob die Empfindlichkeit unseres Indikatorsystems in diesem Bereich nicht mehr ausreicht, um auf höhere Lymphotoxin-Aktivitäten mit einer weiteren Steigerung der Hemmwerte zu reagieren.

Um die Lymphotoxin-Aktivität von Präparationen mit einer Hemmung von mehr als 80% exakter erfassen zu können, haben wir die Lymphotoxin-Präparationen und die entsprechenden Kontrollmedien serienverdünnt und anschließend die toxische Aktivität im DNS-Synthese-Hemm-Test bestimmt.

Werden Indikatorzellen mit Zweifach-Serien-Verdünnungen von Lymphotoxin inkubiert, so resultiert bei semilogarithmischer Auftragung der Werte eine sigmoide Kurve (Abb. 3.2/1): mit zunehmender Lymphotoxin-Konzentration nimmt die DNS-Synthese (3H-Thymidin-Aufnahme) der Indikatorzellen ab, bis sie sich asymptotisch einem Minimalwert (maximal erreichbare Hemmung) nähert.

Trägt man die cpm 3H-Thymidin-Aufnahme der Indikatorzellen logarithmisch auf, so erhält man eine Gerade (Abb. 3.2/2), die die lineare Beziehung zwischen Lymphotoxin-Konzentration und Hemmung der DNS-Synthese in Indikatorzell-Kulturen wiedergibt.

Abb. 3.2/1

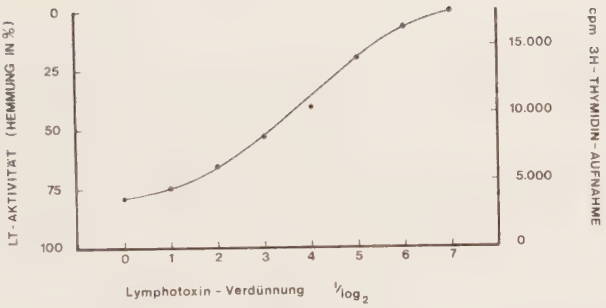


Abb. 3.2/2

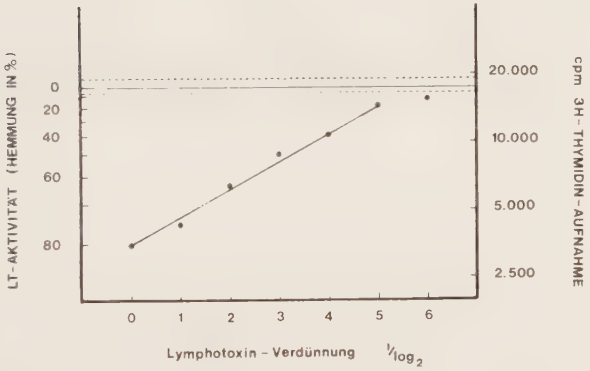


Abb. 3.2/1 Lymphotoxin-Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration (lineare Skala)

Ordinate rechts: Indikatorzell-DNS-Synthese in cpm ^{3}H-Thymidin-Aufnahme
Ordinate links: Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in Prozent

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

Abb. 3.2/2 Lymphotoxin-Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration (logarithmische Skala)

Legende: s. Abb. 3.2/1

Die oberen horizontalen Linien geben den Mittelwert und den Streubereich der Indikatorzell-DNS-Synthese in Kontroll-Kulturen an.

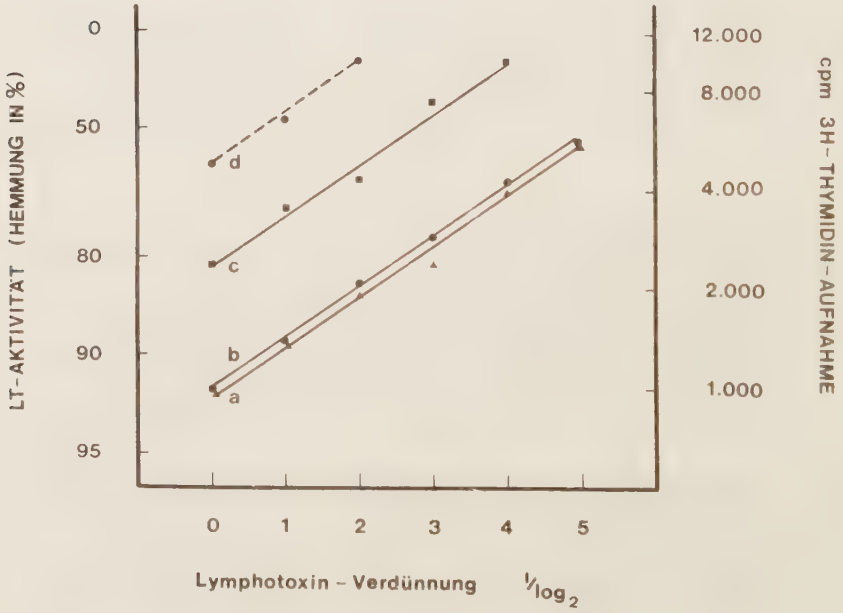
Abb. 3.2/3

Lymphotoxin-Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration
(Vergleich der Wirkung verschiedener Lymphotoxin-Präparationen)

Ordinate rechts: Indikatorzell-DNS-Synthese in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme
Ordinate links: Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in Prozent

Jeder Punkt gibt den Mittelwert von Dreifachbestimmungen an.

Die Geraden a, b und c geben die toxische Aktivität von Lymphotoxin-Präparationen einer gesunden Kontrollperson wieder:
a: Stimulation mit 50 ug PHA
b: Stimulation mit 25 ug PHA
c: Stimulation mit 6,25 ug PHA
Die gestrichelt gezeichnete Gerade gibt die toxische Aktivität in der Lymphotoxin-Präparation eines Patienten wieder;
die Stimulation erfolgte mit 50 ug PHA.



Werden Lymphotoxin-Präparationen verschiedener Aktivität serien-verdünnt und ihre Hemmwirkung getestet, so ergeben sich parallel verlaufende Geraden (Abb. 3.2/3):
Die Neigung der Geraden wird bestimmt durch die Empfindlichkeit der Indikatorzellen (Hemmbarkeit der DNS-Synthese), die Lage der Geraden im Koordinaten-System durch die Lymphotoxin-Aktivität.

Diese Gesetzmäßigkeit der Lymphotoxin-Dosis-Wirkungs-Beziehung ermöglicht, die Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten anzugeben:

> Wir definieren eine Einheit Lymphotoxin als die toxische Aktivität, die unter Standardbedingungen im DNS-Synthese-Hemm-Test eine Verminderung der DNS-Synthese um 50% bewirkt.

Im DNS-Synthese-Hemm-Test werden unter Standardbedingungen 10.000 Indikatorzellen in 150-µl-Kulturen für 48 Stunden mit einer 1:3 verdünnten Lymphotoxin-Präparation inkubiert.

Die Bestimmung der Lymphotoxin-Einheiten von Lymphotoxin-Präparationen unbekannter zytotoxischer Aktivität ist möglich

1. durch Titrierung jeder einzelnen Lymphotoxin-Präparation und direkte Ermittlung der eine 50%ige DNS-Synthese-Hemmung bewirkenden Lymphotoxin-Konzentration (Abb. 3.2/4)

   oder

2. durch indirekte Ermittlung der eine 50%ige DNS-Synthese-Hemmung bewirkenden Lymphotoxin-Konzentration (Abb. 3.2/5):

   Wird im DNS-Synthese-Hemm-Test als Kontrolle und Bezugsgröße eine Lymphotoxin-Präparation bekannter Aktivität serien-verdünnt eingesetzt und werden auf der Dosis-Wirkungs-Kurve die Lymphotoxin-Einheiten eingetragen, so läßt sich die Toxizität weiterer Lymphotoxin-Präparationen dadurch ermitteln, daß man die cpm 3H-Thymidin-Aufnahme der Indikatorzellen in Gegenwart der unverdünnten Präparationen bestimmt und durch horizontale Projektion auf die Referenzgerade die Lymphotoxin-Einheiten berechnet.

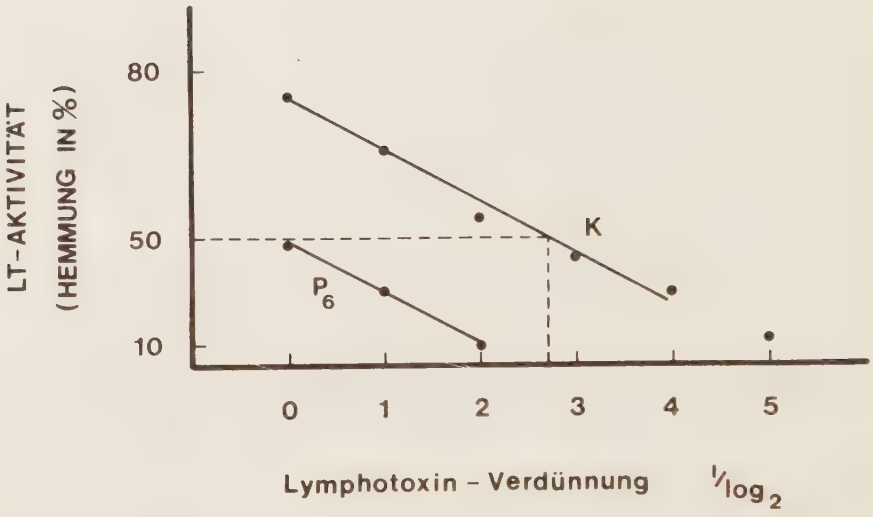


Abb. 3.2/4: Direkte Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität durch Ermittlung der 50%-Hemm-Konzentration:

Ordinate: Hemmung (in %) der DNS-Synthese in Indikatorzell-Kulturen

Abszisse: Lymphotoxin-Verdünnung ($1/\log_2$)

(Vergleichende Untersuchungen bei einer gesunden Person (K) und einem Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom (P_6) - s. Kapitel 4.1.6)

Die 50%-Hemm-Konzentration entspricht bei dem Patienten der unverdünnten ($1/\log_2 = 0$) Lymphotoxin-Präparation, bei der Kontrollperson einer 7-fach verdünnten Lymphotoxin-Präparation: vergleiche die Schnittpunkte der Vertikalen gepunkteten Linien mit der Abszisse.

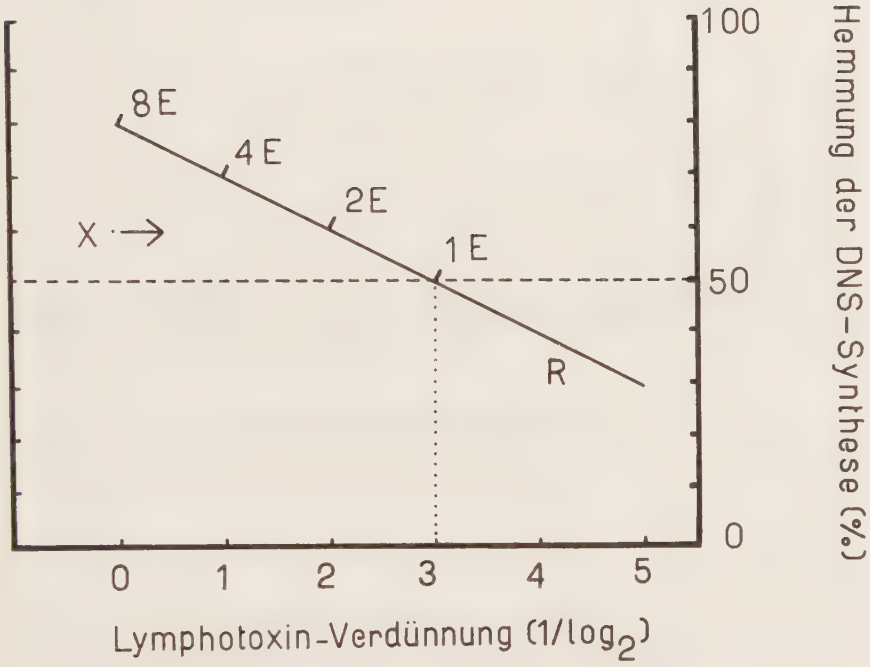


Abb. 3.2/5: Indirekte Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität durch Ermittlung der 50%-Hemm-Konzentration:

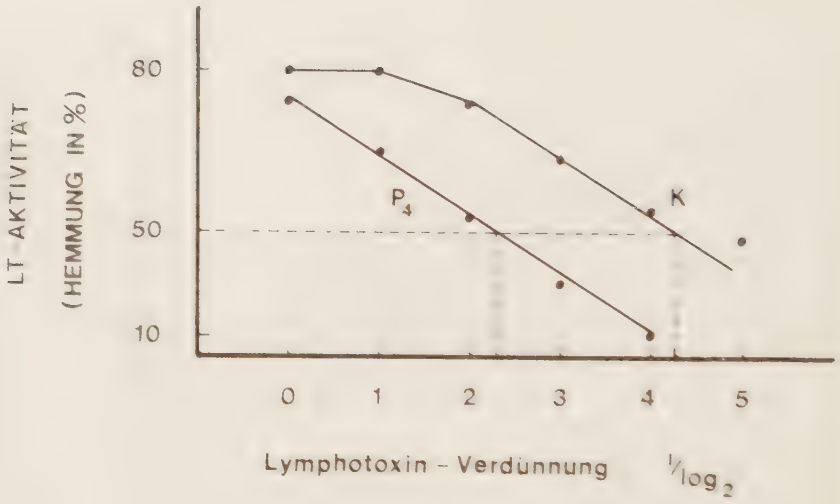
Ordinate: Hemmung (in %) der DNS-Synthese in Indikatorzell-Kulturen

Abszisse: Lymphotoxin-Verdünnung ($1/\log_2$)

Die horizontale gepunktete Linie gibt den 50%-Hemmwert an; der Schnittpunkt dieser Linie mit der Referenz-Kurve (R) gibt die Lymphotoxin-Verdünnung an, die eine zytotoxische Einheit enthält.

Durch Projektion der Lymphotoxin-Verdünnungen (Abszisse) auf die Referenz-Gerade (R) lassen sich dann die Lymphotoxin-Einheiten einzeichnen.

Die zytotoxischen Einheiten einer Lymphotoxin-Präparation unbekannter Aktivität (X) lassen sich ermitteln durch horizontale Projektion der Hemmaktivität auf die Referenz-Gerade (Pfeil).


LT-AKTIVITÄT
(HEMMUNG IN %)
80
50
10
P_4
K
0
1
2
3
4
5
Lymphotoxin - Verdünnung
$^1/\log_2$

Wichtig ist, daß die Referenz-Lymphotoxin-Präparation eine stärkere Aktivität hat als die zu untersuchenden Lymphotoxin-Präparationen:
Im Bereich maximal erreichbarer Hemmung können (auch bei logarithmischer Auftragung der Werte) zwei Lymphotoxin-Präparationen mit unterschiedlicher Aktivität eine nahezu gleich starke Hemmwirkung entwickeln. Übersteigt die Aktivität der zu testenden Lymphotoxin-Präparation die der Referenz-Präparation, so muß sie durch Titrieren in den Aktivitätsbereich der Referenz-Präparation gebracht werden (s. Abb. 3.2/6 als Beispiel).
Erst die Verdünnungsstudie zeigt,daß die scheinbar geringe Differenz der Hemmwerte tatsächlich auf erheblichen Unterschieden in der Aktivität beruht.

Zeigen die Hemmwerte zweier Lymphotoxin-Präparationen bereits in der Original-Konzentration erhebliche Unterschiede, so kann auf die Titration meist verzichtet werden.

KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

4 Klinische Untersuchungen

In diesem Teil der Arbeit wurden Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung bei Patienten mit verschiedenen Immunstörungen untersucht.
Zu den untersuchten Patienten gehörten solche mit definierten Immundefekten entsprechend der Klassifikation der WHO von 1971 (FUDENBERG et al., 1971) (4.1), wie auch solche, deren Anamnese oder Symptome den Verdacht auf eine Immunstörung aufkommen ließen (4.2).

Ziel dieser Untersuchungen war:

1. ausgehend von unserer Arbeitshypothese, nach der die Lymphotoxin-Sekretion eine T-Zell-abhängige Lymphozyten-Funktion ist, zu prüfen, in wieweit zelluläre oder humorale Immundefizienzen mit gestörter Lymphotoxin-Bildung einhergehen;
2. zu prüfen, ob Störungen der Lymphotoxin-Bildung immer kombiniert mit Störungen der Blastentransformation auftreten, oder ob sie auch isoliert beobachtet werden können;
3. den diagnostischen Wert der Lymphotoxin-Bildung bei Immunsubstitutionen (4.1.7) und bei Untersuchungen von Patienten mit unklaren Immunstörungen (4.2) zu prüfen.

Die Angaben über die klinische Symptomatik und die immunologischen Befunde bei den jeweiligen Erkrankungen sind folgenden Übersichtsarbeiten entnommen:
BERGSMA and MCKUSICK (1968), ROSEN (1972), STIEHM and FULGINITI (1973), HITZIG (1973), GELFAND, BIGGAR and ORANGE (1974), BERGSMA, GOOD and FINSTAD (1975), AMMANN and FUDENBERG (1976) und WEBSTER (1977)

4 Klinische Untersuchungen

4.1 Definierte Immundefekte

4.1.1 Agammaglobulinämie (Typ Bruton)
4.1.2 Selektiver IgA-Mangel
4.1.3 Immundefizienz mit Hyper-IgM
4.1.4 Thymus-Hypoplasie (DiGeorge Syndrom)
4.1.5 Ataxia teleangiektatica
4.1.6 Wiskott-Aldrich-Syndrom
4.1.7 Schwere kombinierte Immundefizienz

4.2 Nicht-klassifizierte Immundefekte

4.2.1 "Isolierter Lymphotoxin-Mangel"
4.2.2 Intestinale Lymphangiektasie
4.2.3 Subakute sklerosierende Panenzephalitis, SSPE

4.1.1
Infantile X-chromosomale Agammaglobulinämie

BRUTON beschrieb 1952 einen vier Jahre alten Jungen, der nicht in der Lage war, humorale Antikörper zu bilden, und ständig unter bakteriellen Infektionen litt. Die Agammaglobulinämie (Typ Bruton) gilt als die erste Immunmangelkrankheit, die als solche klar erkannt wurde, und als Prototyp der isolierten humoralen (B-Zell) Immundefizienzen.

Die ersten schweren Krankheitszeichen treten selten vor Ablauf des 6. Lebensmonats auf. Die Patienten sind für bakterielle Infektionen außergewöhnlich anfällig. Zu den häufigsten Krankheiten zählen: Otitiden, Sinusitiden, pulmonale Infektionen, Pyodermien, Meningitiden und Osteomyelitiden. Als Erreger kommen meist Pneumokokken und Hämophilus influenzae in Betracht. Etwa bei der Hälfte der Kinder ist ein der rheumatoiden Arthritis ähnliches Bild zu beobachten (GOOD et al., 1957).

Charakteristisch für die Erkrankung sind:
- extrem niedrige Serum-Ig-Spiegel
- Ausbleiben einer Antikörper-Bildung nach antigenem Reiz
- Fehlen von Immunglobulin-tragenden ("B") Zellen
- Fehlen von Plasmazellen
- Fehlen von Keimzentren in Lymphknoten und Tonsillen

Im Gegensatz zum humoralen Immunsystem soll das zelluläre (thymus-abhängige) Immunsystem bei dieser Erkrankung intakt sein: Im Blut findet man normale bis relativ erhöhte Zahlen sog. T-Lymphozyten, die Blastentransformation von Lymphozyten als Antwort auf eine Stimulation mit PHA ist normal, Hauttests vom verzögerten Typ fallen positiv aus (COOPERBAND et al., 1968).

Der von uns untersuchte Patient M.D., ein 18 Monate alter Junge, litt unter rezidivierenden Sinusitiden, Bronchitiden und Pneumonien. Mit der quantitativen Bestimmung der Immunglobuline nach MANCINI (1964) ließen sich im Serum des Kindes keine Immunglobuline nachweisen.

Die Lymphozyten des Patienten konnten zu normaler Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung stimuliert werden (Tab. 4.1.1).

Diese Befunde bestätigen unsere Hypothese, daß wir mit diesen Tests thymus-abhängige Lymphozyten-Funktionen bestimmen und daß humorale Immundefekte (soweit sie isoliert auftreten) die Untersuchungsergebnisse nicht beeinflussen.

Tab. 4.1.1
Lymphozyten-Funktionen bei infantiler X-chromosomaler Agammaglobulinämie (Pat.: D.M.)

1. Blastentransformation (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Kultur)

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	808 ± 195	227 ± 39
PHA 6,25 µg	68.974 ± 6777	79.400 ± 1231
PHA 25 µg	49.339 ± 376	50.358 ± 2267
PHA 50 µg	30.660 ± 10736	26.124 ± 1690

2. Lymphotoxin-Bildung

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	4.243	4.053
PHA 6,25 µg	2.906 (-32%)	739 (-82%)
PHA 25 µg	772 (-82%)	391 (-90%)
PHA 50 µg	455 (-89%)	374 (-91%)

Legende:

Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikatorzell-Kulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

4.1.2
Selektiver IgA-Mangel

Der selektive IgA-Mangel ist wohl die am häufigsten beobachtete Immunstörung: in der "Normalbevölkerung" tritt sie mit einer Häufigkeit von etwa 1:700 auf.

Immunologisch ist die Erkrankung charakterisiert durch niedrige IgA-Titer bei normalen oder erhöhten Titern der übrigen Immunglobuline und - nach bisheriger Meinung - normalen zellulären Immunreaktionen.

Im Gegensatz zu früher nimmt man heute an, daß es sich beim selektiven IgA-Mangel nicht um eine "Normvariante", sondern um eine Störung handelt, die zu anderen Erkrankungen disponiert: zu rezidivierenden sinu-pulmonalen Infektionen, Allergien, Autoimmun- und malignen Erkrankungen.

Die Ursache des selektiven IgA-Mangels ist nicht bekannt. Da Patienten mit dieser Störung eine normale Zahl IgA-tragender Lymphozyten besitzen, wird vermutet, daß die Störung durch eine verminderte Synthese oder Sekretion von IgA hervorgerufen wird. Der häufig gleichzeitig bestehende Mangel an sekretorischem IgA könnte dazu führen, daß der Organismus ständig von Erregern und Antigenen getroffen wird, die dann zu den häufig mit einem IgA-Mangel kombinierten Störungen führen: Rezidivierende Infektionen der Respirationsorgane, Allergien, gastrointestinale Störungen (Zöliakie, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, perniziöse Anämie), andere Autoimmunerkrankungen und Malignome.

Die von uns untersuchte Patientin (Ba.D.) mit selektivem IgA-Mangel wurde an der Univ.-Kinderklinik Gießen (Prof. Lampert) wegen rezidivierender Sinubronchitiden betreut.
Die Blastentransformation war bei der Patientin und ihren beiden (klinisch) gesunden Brüdern normal, die Lymphotoxin-Bildung jedoch bei allen drei Geschwistern vermindert bis fehlend (Tab. 4.1.2). Diese Befunde weisen auf eine familiäre partielle zelluläre Immunstörung in der Familie der Patientin

Tab. 4.1.2
Lymphozyten-Funktionen bei selektivem IgA-Mangel

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin
1. Patientin (Bä.D.)		
0	285 ± 15	10.279
PHA 6,25 ug	25.217 ± 1062	9.956
PHA 25 ug	60.052 ± 3092	10.259
PHA 50 ug	51.771 ± 6126	9.348 (- 9%)
2. Mutter		
0	592 ± 10	9.423
PHA 6,25 ug	61.422 ± 12865	9.412
PHA 25 ug	98.952 ± 12625	3.199 (-66%)
PHA 50 ug	80.675 ± 8956	2.393 (-75%)
3. Bruder (Kl.D.)		
0	1.102 ± 55	9.369
PHA 6,25 ug	37.700 ± 6430	10.318
PHA 25 ug	90.246 ± 681	10.570
PHA 50 ug	73.646 ± 1911	9.200
4. Bruder (Ha.D.)		
0	904 ± 217	7.045
PHA 6,25 µg	29.737 ± 1023	7.377
PHA 25 µg	67.216 ± 3187	7.601
PHA 50 ug	50.086 ± 2415	5.239 (-26%)

Legende:
Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.
Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikator-Zellkulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

hin. Weitere Untersuchungen bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel werden zeigen müssen, ob eine enge Korrelation besteht zwischen dieser Immundefizienz und einem Lymphotoxinmangel.

4.1.3
X-chromosomal vererbte Immundefizienz mit Hyper-IgM

Patienten mit dieser Erkrankung leiden unter rezidivierenden Infektionen (Otitis media, Pneumonie, Sepsis); bei einigen treten außerdem Thrombozytopenie, Neutropenie, Nierenstörungen oder aplastische oder hämolytische Anämien auf. Gefährdet sind die Patienten durch maligne Erkrankungen, vorwiegend im Gastrointestinaltrakt und durch Infektionen.

Der Immundefekt der Patienten ist charakterisiert durch erhöhte Serum-Spiegel von IgM, bei normalen, häufig jedoch erniedrigten Spiegeln von IgA und IgG. Zelluläre Immunstörungen konnten bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Der von uns untersuchte Patient (F.Go.) war 4.6 Jahre alt; er hatte wiederholt Pneumonien und einmal eine aphthöse Stomatitis. Ein Bruder des Patienten war an einer foudroyant verlaufenden Varizellen-Infektion mit Enzephalitis verstorben.

Außer dem typischen Ig-Muster mit erhöhtem IgM und niedrigem IgA und IgG hatte der Patient eine Neutropenie. Die Hauttests vom Tuberkulin-Typ waren positiv.

Die Untersuchung der Blastentransformation bei diesem Patienten zeigte eine verminderte Reaktion auf die Stimulation mit niederer PHA-Dosis, im übrigen aber normale Werte. Die Lymphotoxin-Bildung dagegen war deutlich gestört: die maximale Hemm-Aktivität betrug 23%. Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß der Junge einen normalen Anteil E-Rosettenbildender Zellen hatte (Befund Dr. Belohradsky).

Diese Untersuchungsergebnisse (Tab. 4.1.3) weisen darauf hin, daß die Dysgammaglobulinämien nicht nur als reine humorale Immunstörungen angesehen werden dürfen, sondern daß sie auch diskrete Störungen im zellulären Immunsystem zeigen. Diese Störungen werden jedoch durch Hauttests und Bestimmung der

Zahl der "T-Zellen" im Blut nicht evident; erst funktionelle Untersuchungen, wie die Prüfung der Lymphotoxin-Sekretion, lassen den diskreten zellulären Immundefekt evident werden. Als Beweis für das Vorliegen einer zellulären Immundefizienz bei diesem zumeist X-chromosomal vererbten Leiden sehen wir die letal ausgegangene Varizellen-Infektion des Bruders unseres Patienten an.

Tab. 4.1.3
Lymphozyten-Funktionen bei X-chromosomaler Immundefizienz mit Hyper-IgM (Pat.: F.Go.)

1. Blastentransformation (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Kultur)

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	209 ± 77	180 ± 76
PHA 6,25 ug	6.649 ± 1839	22.138 ± 826
PHA 25 ug	26.581 -	29.541 ± 1166
PHA 50 ug	26.951 ± 4313	21.137 ± 1837

2. Lymphotoxin-Bildung

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	7.430	7.886
PHA 6,25 ug	7.816	6.037 (-23%)
PHA 25 ug	6.519 (-12%)	2.309 (-71%)
PHA 50 ug	5.708 (-23%)	2.767 (-65%)

Legende:
Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.
Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikator-Zellkulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

4.1.4
Konnatale Thymushypoplasie (DiGeorge Syndrom)

Das DiGeorge Syndrom (DiGEORGE 1968) ist eine der wenigen Immundefizienzen, deren Symptome unmittelbar bei Geburt bereits erkennbar sind: Abnormalitäten des Gesichts, Hypoparathyreoidismus, Herzmißbildung, zelluläre Immundefizienz. Die seitliche Röntgenaufnahme des vorderen Mediastinums zeigt gewöhnlich das Fehlen des Thymusschattens. Der Erkrankung liegt eine Störung der embryonalen Entwicklung der 3. und 4. Kiemenbögen zugrunde.
Die immunologischen Untersuchungen zeigen gewöhnlich niedrige Lymphozyten-Zahlen im Blut, verminderte Zahl E-Rosetten-bildender Lymphozyten und keine Reaktion der Lymphozyten auf PHA und allogene Zellen (LISCHNER and HUFF, 1975). Die meisten der Patienten haben neben dem zellulären Immundefekt auch Störungen der Antikörper-Bildung (LISCHNER and DiGEORGE, 1969).

Der von uns untersuchte Patient wurde am ersten Lebenstag auffällig wegen einer Hypocalcämie. Untersuchungen der Lymphozyten-Funktionen ergaben außer einer fehlenden Blastentransformation ein völliges Fehlen der Lymphotoxin-Bildung (Tab. 4.1.4).

Tab. 4.1.4: Lymphozyten-Funktionen bei DiGeorge Syndrom (Pat.: L.N.)

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
-	1.297 ± 475 cpm	12.584 cpm
50 µg PHA	1.376 ± 612 cpm	12.823 cpm

Legende:

Da der Patient sich in einem lymphopenischen Zustand befand, konnte nur mit einer Dosis PHA stimuliert werden.

Blastentransformation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Lymphozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikatorzell-Kulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

4.1.5
Ataxia teleangiectatica

Das Krankheitsbild wurde 1941 erstmals von Denise LOUIS-BAR als Phakomatose beschrieben. Es ist gekennzeichnet durch zerebelläre und extrapyramidale Ausfälle, Teleangiektasien, endokrine Störungen sowie eine Neigung zu chronischen Infektionen als Folge einer (kombinierten) Immundefizienz. Klinisch imponiert eine bereits im frühen Kindesalter auftretende progressive Ataxie. Die Diagnose läßt sich meist erst stellen, wenn - zwischen dem 2. und 9. Lebensjahr - Teleangiectasien an den Konjunktiven, im Gesicht und an den Extremitäten in Erscheinung treten. Die Erkrankung wird autosomal recessiv vererbt.

Wie die übrigen Symptome, so variiert das Ausmaß der Immundefizienz von Patient zu Patient, aber auch beim einzelnen Patienten zu verschiedenen Zeiten; mit zunehmendem Alter läßt sich jedoch eine Progredienz der Symptome feststellen und bei den meisten Patienten führt die Erkrankung zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr zum Tode, entweder durch letal verlaufende Infektionen oder durch lympho-retikuläre Malignome (BODER und SEDGWICK, 1958; PETERSON et al., 1964; BIGGAR and GOOD, 1975).

Die Immundefizienz betrifft sowohl das zelluläre wie auch das humorale Immunsystem. Etwa 80% der Patienten haben niedrige Titer von Serum- und sekretorischem IgA (EPSTEIN et al., 1966; TOMASI 1968). Bei einigen Patienten wurden Antikörper gegen IgA und ein erhöhter Katabolismus von (injiziertem, radioaktiv markiertem) IgA nachgewiesen (STROBER et al., 1968;)

Alle Patienten haben zelluläre Immunstörungen: autoptisch lassen sich regelmäßig Hypo- oder Aplasien des Thymus und eine Unterentwicklung des lymphatischen Gewebes nachweisen (BODER und SEDGWICK, 1958; PETERSON et al., 1966). Zelluläre Immunreaktionen (Hauttests vom Spättyp, Allotransplantatabstoßung und Stimulierbarkeit von Lymphozyten) können gestört sein (EISEN et al., 1965; OPPENHEIM et al., 1966).

Der von uns untersuchte Patient (Br. H.) war 8 Jahre alt und wurde in der Univ.-Kinderklinik Giessen von Prof. Lampert betreut.

Die Reaktion der Lymphozyten auf PHA-Stimulation war dadurch auffällig, daß keine Blastentransformation nachweisbar war, daß aber eine minimale, jedoch mit steigender PHA-Dosis gering zunehmende Lymphotoxin-Sekretion meßbar war (Tab. 4.1.5).

Tab. 4.1.5
Lymphozyten-Funktionen bei Ataxia teleangiectatica

1. Blastentransformation (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme/Kultur)

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	-	236 ± 30
PHA 6,25 ug	462 ± 180	19.512 ± 2.948
PHA 25 ug	278 ± 30	43.101 ± 4.088
PHA 50 ug	237 ± 13	34.900 ± 4.907

2. Lymphotoxin-Bildung

Stimulans	Patient	Kontrollperson
0	30.730	33.784
PHA 6,25 ug	30.217 (- 2%)	32.767 (- 4%)
PHA 25 ug	26.982 (-16%)	9.162 (-73%)
PHA 50 ug	24.828 (-20%)	5.013 (-85%)

Legende:

Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikator-Zellkulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

4.1.6
Wiskott-Aldrich-Syndrom

Das Wiskott-Aldrich Syndrom ist charakterisiert durch die Trias: rezidivierende Infektionen, Ekzem und thrombopenische Blutungen. Die Erkrankung führt in der Regel bereits im frühen Kindesalter zum Tode, entweder durch Infektionen (bedingt durch die Immunstörungen), Blutungen (bedingt durch die Thrombozytopenie und -pathie) oder durch Malignome ausgehend vom reticulo-lymphozytären System. Die Erkrankung wird X-chromosomal recessiv vererbt (WISKOTT; 1937; ALDRICH et al., 1954; COOPER et al., 1968).

Die Immunstörungen betreffen sowohl das zelluläre, wie auch das humorale Immunsystem: In der Regel sind die Serum-Spiegel von IgA und IgE erhöht, die von IgM erniedrigt. Die Isohämagglutinine (IgM) fehlen oder sind nur in niedriger Titerstufe nachweisbar. Die Antikörperbildung nach spezifischer Immunisierung, besonders nach Immunisierung mit Polysaccharid-Antigenen, ist erheblich gestört (BLAESE et al., 1968; COOPER et al., 1968; BLAESE et al., 1975).
Störungen der zellulären Immunreaktionen (Thymus-abhängiges Immunsystem) zeigen sich in negativen Hauttests vom Spät-Typ und im Ausbleiben einer Transplantat-Abstoßung nach Haut-Transplantationen (BLAESE et al., 1975).

In einer Reihe veröffentlichter Untersuchungen werden zwar gestörte Lymphozyten-Funktionen beschrieben (ALTMANN et al., 1974; OPPENHEIM et al., 1970; OPPENHEIM et al., 1973); es erscheinen jedoch immer wieder Berichte über normale Lymphozyten-Funktionen bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (SHERWOOD und BLAESE, 1973; OPPENHEIM et al., 1973; BLAESE et al., 1975), so daß über die Frage nach zellulären Immunstörungen, die durch in vitro-Untersuchungen erkannt werden können, widersprüchliche Auffassungen bestehen.

Patienten und Kontrollpersonen

Untersucht wurden insgesamt 6 Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom in 10 Untersuchungen; ein Patient wurde im Abstand von 8 Monaten zweimal und ein weiterer innerhalb von 2 1/4 Jahren viermal untersucht. Tab.4.1.6/1 gibt eine Übersicht über Alter und die Haupt-Krankheits-Symptome der Patienten.

Die Studie wurde so durchgeführt, daß bei jedem Lymphozyten-Funktions-Test eines Patienten die Lymphozyten einer gesunden Kontrollperson mit untersucht wurden. Auf diese Weise war es möglich, Untersuchungspaare zu bilden und die Untersuchungsergebnisse jedes Patienten mit denen einer individuellen Kontrollperson zu vergleichen (individuelle Kontrollen, n = 10). Zusätzlich zu diesen Kontrollpersonen wurden zu den gleichen Zeitpunkten (im Rahmen anderer Studien) noch weitere gesunde Personen untersucht; die Gruppe dieser Personen (n = 14) und die Gruppe der individuellen Kontrollen wird im folgenden als Kontrollgruppe bezeichnet (n = 24).

Tab.4.1.6/1
Klinische Daten der Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom
(siehe auch BELOHRADSKY et al., 1978)

Untersuchung	Patient	Alter bei Untersuchung	Hauptbeschwerden
1	N.A.	3 Jahre	blutige Diarrhoen Petechien Ekzem rezidivierende Infektionen Coombs-neg. hämolyt. Anämie Retikulumzell-Sarkom
2	St.S.	2.4 Jahre	Petechien Melaena
3		3 Jahre	Epistaxis Ekzem rezidivierende Infektionen Lymphadenopathie Splenomegalie
4	B.J.	10.3 Jahre	Petechien Melaena Epistaxis Ekzem rezidivierende Infektionen (vor allem viral)
5	L.T.	2.8 Jahre	Ekzem Petechien keine gesteigerte Infekt- anfälligkeit
6	K.F.	6.7 Jahre	Epistaxis Melaena Ekzem Petechien bakterielle Infektionen Lymphadenopathie
7	R.R.	6 Jahre	Ekzem blutige Diarrhoen rezidivierende Infektionen
8		6.2 Jahre	
9		7.2 Jahre	
10		8.3 Jahre	

Spontane 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen von Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom und gesunden Kontrollpersonen.

In nicht-stimulierten Leukozyten-Kulturen der Kontrollpersonen lag die spontane 3H-Thymidin-Aufnahme zwischen 105 und 447 cpm. Innerhalb dieses Bereiches lagen nur zwei Werte der Patienten, bei den übrigen fand sich eine deutlich höhere Einbaurate (Abb.4.1.6/1: Untersuchung 1 bis 6). Die Untersuchungen 7 bis 10 (siehe Tab.4.1.6/3) können mit den übrigen nicht verglichen werden, weil sie mit einer höheren Lymphozyten-Zahl durchgeführt wurden.

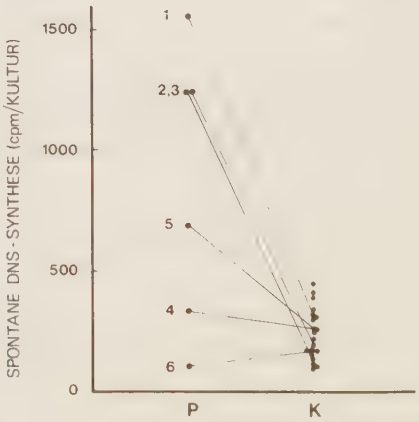


Abb.4.1.6/1: Spontane 3H-Thymidin-Aufnahme in unstimulierten Leukozyten-Kulturen von Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (P) und Personen der Kontrollgruppe (K). Die Linien verbinden die Werte der Patienten und die der individuellen Kontrollpersonen.

Die Punkte geben die Mittelwerte von je Dreifachbestimmungen wieder.

Blastentransformation bei Wiskott-Aldrich-Syndrom
(Abb. 4.1.6/2 und 4.1.6/3)

Stimulation mit niederer PHA-Dosis (Endverdünnung 1:5120 entsprechend 6,25 µg) induzierte in Leukozyten-Kulturen der Patienten eine nur minimale Blastentransformation: Mittlere 3H-Thymidin-Aufnahme für die Gruppe der Patienten 8.500, für die Kontrollgruppe 52.000 cpm. Bis auf eine Ausnahme (Untersuchung 5) lag die Blastentransformation der Patienten unter dem niedrigsten Wert der Kontrollgruppe (9.400 cpm).

Nach Stimulation mit höheren PHA-Dosen (1:1280 und 1:640 entsprechend 25 und 50 µg) dagegen ließ sich kein Unterschied in der Höhe der Blastentransformation beider Gruppen mehr feststellen.

Die unterschiedliche Stimulierbarkeit der Lymphozyten von Wiskott-Aldrich-Patienten und gesunder Kontrollpersonen wird besonders deutlich, wenn man die mittleren cpm der 3H-Thymidin-Aufnahme der beiden Gruppen vergleicht (Abb. 4.1.6/2): Die Erhöhung der PHA-Dosis von 6,25 µg auf 25 bzw. 50 µg führte in der Kontrollgruppe zu einer geringen Zunahme der cpm (von 52.000) auf 64.000 (1:1280) bzw. eine Abnahme auf 46.000 (1:640); in der Gruppe der Patienten dagegen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der cpm (von 6.400) auf 43.000 (1:1280) bzw. 49.000 (1:640).
Ähnliche Ergebnisse erhält man, wenn man die Blastentransformation der Lymphozyten einzelner Patienten mit denen der gepaarten Kontrollen vergleicht (Abb. 4.1.6/3):
Während bei den Kontrollpersonen bereits niedere PHA-Dosen maximale Blastentransformation induzieren und höhere Dosen zu einem Rückgang der cpm führen (vergleiche Abb. 3.2), kommt es bei den Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom zu einer langsam zunehmenden Blastentransformation. Bei maximaler Stimulation (1:640 bzw. 50 µg PHA) läßt sich zwischen den Kontrollpersonen und den Patienten kein Unterschied in der Blastentransformation mehr feststellen: die Störung der Blastentransformation läßt sich also nur nach Stimulation mit niederen
- nachweisen.

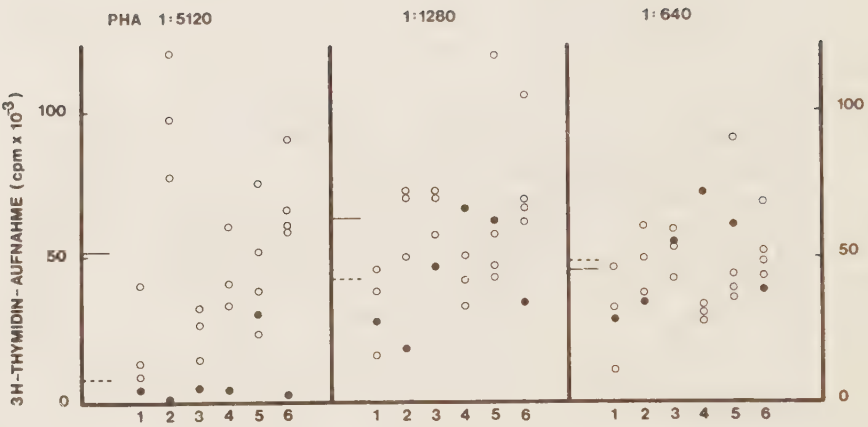


Abb. 4.1.6/2:

PHA-induzierte Blastentransformation bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (Punkte) und gesunden Kontrollpersonen (Kreise).

Ordinaten: Blastentransformation angegeben als DNS-Synthese (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme) in stimulierten Kulturen.

Abszisse: Die Zahlen geben die Untersuchungsnummern an (s. (s. Tab. 4.1.6/1)

Die zur Stimulation verwendeten PHA-Dosen sind jeweils oben angegeben.

Die horizontalen Linien an den Ordinaten links sind die Mittelwerte der beiden untersuchten Gruppen:
Kontrollpersonen (ausgezogene Linie) ; Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (gestrichelte Linie) .

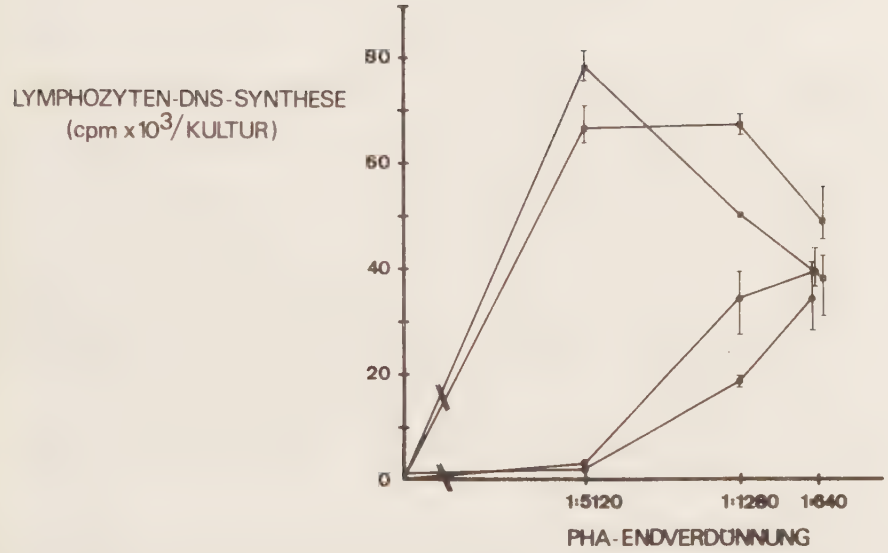


Abb. 4.1.6/3: Blastentransformation bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (untere Kurven bzw. Punkte) und gesunden Kontrollpersonen (obere Kurven bzw. Quadrate)

Jeder Punkt gibt die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen wieder; die vertikalen Linien geben den Streubereich der Einzelwerte an

Lymphotoxin-Bildung bei Wiskott-Aldrich-Syndrom
(Abb. 4.1.6/4 und Tab. 4.1.6/3)

In allen 10 Untersuchungen war die Lymphotoxin-Bildung der PHA-stimulierten Lymphozyten der Patienten im Vergleich zu der der Kontrollpersonen vermindert.
Nach Stimulation mit niedriger PHA-Dosis (6,25 ug) bilden die Lymphozyten aller Kontrollpersonen Lymphotoxin, während in der Gruppe der Patienten nur in einer von 6 Untersuchungen eine Lymphotoxin-Bildung nachzuweisen ist (Abb. 4.1.6/4 links).
Nach Stimulation mit mittlerer PHA-Dosis (25 ug) wird der Unterschied in der Lymphotoxin-Sekretion der beiden Gruppen am deutlichsten: keiner der Patienten erreicht den unteren Grenzwert des Normalbereichs von 50% Hemmung (Abb. 4.1.6/4 Mitte).
Nach Stimulation mit hoher PHA-Dosis (50 ug) kommt es zu einer (scheinbar) gleich starken Lymphotoxin-Sekretion beider Gruppen (Abb. 4.1.6/4 rechts).

Erklärt wird die scheinbare Überlappung der Werte durch die abnehmende Empfindlichkeit des Lymphotoxin-Testes im oberen Hemmbereich (vgl. Kapitel 3.2): Mit Zunahme der Stimulation steigt die meßbare Lymphotoxin-Aktivität der Kontrollgruppe nur noch minimal, die der Patienten-Gruppe jedoch relativ stark an (vgl. die mittlere Lymphotoxin-Aktivität der beiden Gruppen).
Die Berechnung der zytotoxischen Lymphotoxin-Einheiten nach der direkten Bestimmungsmethode (s. Kapitel 3.2) ergibt dann, daß nach Stimulation mit 50 ug PHA alle Patienten weniger und alle Kontrollpersonen mehr als 500 Einheiten Lymphotoxin bildeten (s. Tab. 4.1.6/2).

Wiederholte Untersuchungen der Lymphozyten-Funktionen
(Tab. 4.1.6/3)

Während einer mehr als zwei-jährigen Beobachtungszeit eines der Patienten blieben die Untersuchungsergebnisse, insbesondere die Lymphotoxin-Sekretion konstant.

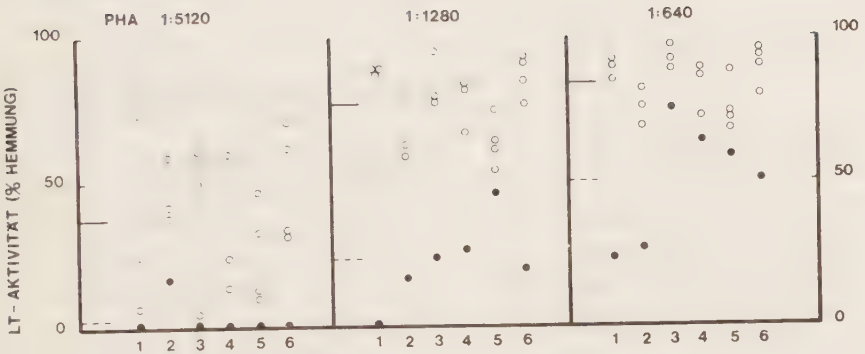


Abb. 4.1.6/4

PHA-induzierte Lymphotoxin-Bildung bei Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (Punkte) und gesunden Kontrollpersonen (Kreise).

Ordinaten: Lymphotoxin-Aktivität angegeben als Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in Prozent.
Jeder Wert ist der Mittelwert von Dreifachbestimmungen.

Abszisse: Untersuchungsnummer (s. Tab. 4.1.6/1); die Untersuchungen 2 und 3 sind wiederholte Untersuchungen eines Patienten.

Die zur Stimulation verwendete PHA-Dosis ist (als Endkonzentration) jeweils oben angegeben.

Die horizontalen Linien an den Ordinaten links sind Mittelwerte der beiden untersuchten Gruppen:
Ausgezogene Linie: Kontrollpersonen
Gestrichelte Linie: Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom.

Tab. 4.1.6/2: Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität in Einheiten - vergleichende Untersuchung bei 5 Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom und 6 gesunden Kontrollpersonen

	Zahl der Untersuchungen	
Lymphotoxin-Einheiten	Patienten	Kontrollen
0 - 100 Einheiten	3	0
100 - 500 Einheiten	3	0
500 - 1000 Einheiten	0	5
über 1000 Einheiten	0	1

Legende: Untersucht wurde die Lymphotoxin-Bildung der Untersuchungen 1 bis 6 der Studie und die "individuellen Kontrollpersonen".

Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte mit 50 ug PHA

Definition der Lymphotoxin-Einheiten s. Kap. 3.2

Tab. 4.1.6/3

Wiederholte Untersuchungen von Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung bei einem Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (Pat.: R.R.)

Untersuchung	Blastentransformation		Lymphotoxin-Bildung		PHA
	Patient	Kontrolle	Patient	Kontrolle	
7	250	659	19.713	19.270	-
	3.866 ± 717	83.585 ± 8920	17.136 (-13%)	6.264 (-68%)	+
8	206	552	13.760	14.221	-
	12.010 ± 2011	33.647 ± 6037	11.978 (-13%)	5.316 (-73%)	+
9	376	405	11.812	12.470	-
	4.712 ± 1612	51.042 ± 1684	10.858 (- 8%)	4.864 (-61%)	+
10	166	970	20.543	19.806	-
	3.178 ± 381	82.051 ± 4967	18.234 (-11%)	6.742 (-66%)	+

Legende: Alter des Patienten bei den Untersuchungen 7 bis 10 s. Tab. 4.1.6/1

Blastentransformation: die angegebenen Werte sind Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen (cpm 3H-Thymidin-Einbau in Lymphozyten-Kulturen)

Lymphotoxin-Bildung: die angegebenen Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen (cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikatorzell-Kulturen)

Als Indikatorzellen dienten Hepatom-Zellen

Pro Leukozyten-Kultur wurden 400.000 Lymphozyten stimuliert mit 25 ug PHA

4.1.7
Schwere kombinierte Immundefizienz

GLANZMANN und RINICKER beschrieben 1950 ein "neues" Krankheitsbild, die "Essentielle Lymphozytophthisis": zwei nicht miteinander verwandte Kleinkinder erlagen im zweiten Lebensjahr nicht beherrschbaren Infektionen. Die Krankheitssymptome hatten bereits im ersten Lebensjahr begonnen mit immer wieder aufflakkernden Infektionen, kaum beeinflußbaren Diarrhoen, Soor-Befall und einem anhaltenden morbilliformen Exanthem. Die Autoren bezeichneten die Erkrankung als Essentielle Lymphozytophthisis, weil sie bei beiden Kindern eine ausgeprägte, persistierende Lymphozytopenie beobachtet hatten.

Seit der Erstbeschreibung sind viele Kinder mit dieser Erkrankung beschrieben worden (s. auch HITZIG et al., 1968 und HITZIG 1973). Wesentlich für das Verständnis der Erkrankung war die Beobachtung von TOBLER und COTTIER (1958), daß die Erkrankung mit einer Agammaglobulinämie einhergeht. Ferner wird eine Leukopenie, vorwiegend eine Lymphopenie beobachtet; das Knochenmark und die lymphatischen Organe sind verarmt an Plasmazellen, Lymphozyten und Lymphoblasten.
Neben der humoralen Immundefizienz werden zelluläre Immunstörungen gefunden: Hauttests vom Spät-Typ fallen negativ aus, allogene Hauttransplantate werden ohne Zeichen einer Abstoßung toleriert, Lymphozyten der Patienten reagieren nicht auf Antigen- oder Mitogen-Stimulation in vitro und E-Rosetten-bildende Zellen sind nicht nachweisbar.

Die schwere kombinierte Immundefizienz, im Englischen "severe combined immunodeficiency disease" ("SCID"), ist einer der verbreitetsten genetisch bedingten Immundefekte. Exakte Zahlenangaben über die Häufigkeit der Erkrankung gibt es nicht, da immer noch viele der Patienten sterben, ohne daß die Diagnose gestellt wird. Nach ROSEN (1973) beruhen etwa 10% der außerhalb der Neugeborenen-Periode auftretenden frühkindlichen Todesfälle auf dieser Form der Immundefizienz.

Die Erkrankung kann
- autosomal rezessiv ("Schweizer Typ") oder
- X-chromosomal ("Gitlin Typ") vererbt werden, sowie auch
- sporadisch auftreten. Klinisch lassen sich die verschiedenen Formen der schweren kombinierten Immundefizienz nicht unterscheiden.

Außer durch exogene und endogene Infektionen sind die Patienten durch ärztliche Maßnahmen gefährdet:
Impfungen mit Lebendimpfstoff (BCG- und Pockenschutzimpfung) führen zu generalisierten Infektionen (BCGitis bzw. Vaccinia generalisata). Bluttransfusionen haben eine meist letal ausgehende "Graft-versus-Host-Reaktion" zur Folge (s. Kap. 4.1.7.1).

Wir haben in den letzten Jahren 6 Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz untersucht. Drei der Patienten wurden in der Univ.-Kinderklinik Ulm und ein vierter in der Kinderklinik Salzburg betreut; bei einem der Kinder konnten wir aufgrund der Familienanamnese die X-chromosomal vererbte Form der Erkrankung diagnostizieren. Dieses Kind ist an den Folgen einer akuten Graft-versus-Host-Reaktion verstorben (s. Abschnitt 4.1.7.1). Bei drei Patienten wurde versucht, durch Transplantation von Knochenmark bzw. fetalem Thymus eine Immunrestitution zu erreichen.

Tab. 4.1.7/1
Lymphozyten-Funktionen von Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz im Vergleich mit den Kontrollpersonen

1. Patient D.S.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	2.198 ± 308	18.700
PHA 6,25 ug	1.864 ± 139	19.855
PHA 25 ug	1.791 ± 1	18.922
PHA 50 ug	1.338 ± 120	18.879

Kontrolle

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	187 ± 82	21.899
PHA 6,25 ug	21.876 ± 672	19.294 (-12%)
PHA 25 ug	43.235 ± 2.086	7.460 (-66%)
PHA 50 ug	38.574 ± 1.906	5.124 (-77%)

2. Patient K.M.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	620 ± 81	5.364
PHA 6,25 ug	150 ± 24	4.842
PHA 25 ug	93 ± 5	4.969
PHA 50 ug	82 ± 18	5.009

Kontrolle

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	96 ± 26	6.631
PHA 6,25 ug	41.457 ± 7.747	4.929 (-26%)
PHA 25 ug	79.919 ± 11.741	.626 (-90%)
PHA 50 ug	63.073 ± 27.096	.245 (-96%)

Legende:

Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikatorzell-Kulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

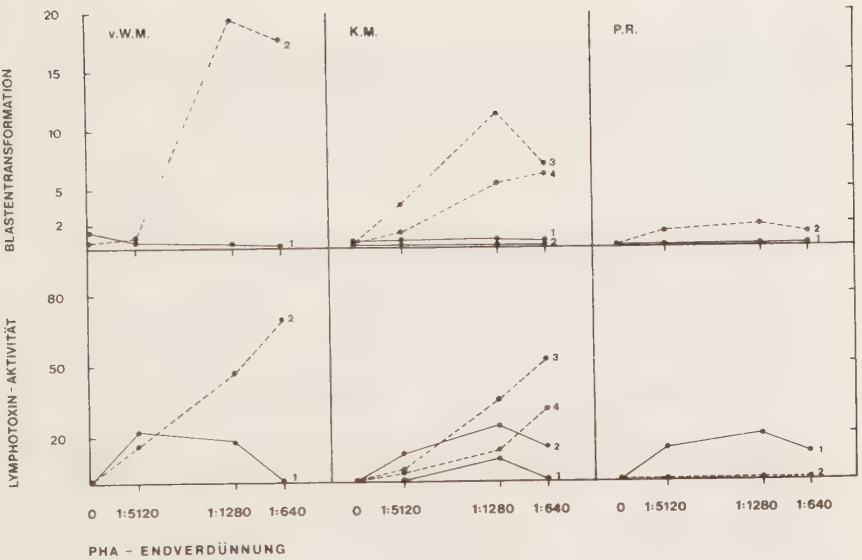


Abb. 4.1.7/1

Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung bei Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz vor und nach Immunrestitution

Ordinaten:

oben: Blastentransformation, angegeben als DNS-Synthese in stimulierten Leukozytenkulturen (cpm 3H-Thymidin-Aufnahme x 1.000)

unten: Lymphotoxin-Aktivität, angegeben als Hemmung der Indikatorzell-DNS-Synthese in Prozent

Abszisse: Endverdünnung der zur Stimulation verwendeten PHA-Dosis

Die Einzelwerte sind aus Tab. 4.1.7/2 zu ersehen

Die jeweils am Ende der Linien angegebenen Zahlen entsprechen der in Tab. 4.1.7/2 aufgeführten Untersuchungs-Nr. des jeweiligen Patienten

Ausgezogene Linie verbindet die vor Immunrestitution bestimmten Werte

Gestrichelte Linie verbindet die nach erfolgter Immunrestitution bestimmten Werte

Tab. 4.1.7/2.1
Lymphozyten-Funktionen bei Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz vor und nach Immunrestitution

Patient P.R.

1. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	75	12.063
PHA 6,25 ug	62	10.392 (-14%)
PHA 25 ug	115 ± 9	9.769 (-2o%)
PHA 50 ug	94	10.715 (-12%)

2. Untersuchung: nach Behandlung mit fetalem Thymus und Transfer-Faktor

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	638 ± 63	11.353
PHA 6,25 ug	1.409 ± 97	12.861
PHA 25 ug	1.946 ± 161	13.300
PHA 50 µg	1.124 ± 176	11.838

Patient v.W.M.

1. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	1.560	11.355
PHA 6,25 µg	572	8.811 (-22%)
PHA 25 µg	457 ± 20	9.393 (-18%)
PHA 50 µg	365	11.970

2. Untersuchung: nach Knochenmark-Transplantation

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	488 ± 50	11.196
PHA 6,25 µg	8.059	9.440 (-16%)
PHA 25 µg	19.502 ± 737	5.917 (-47%)
PHA 50 µg	15.816 ± 1102	3.356 (-70%)

Tab. 4.1.7/2.2

Lymphozyten-Funktionen eines Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz vor und nach Knochenmark-Transplantation

Patient K.M.

1. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung	
0	745 ± 161	24.995	
PHA 6,25 ug	774 ± 17	27.788	
PHA 25 ug	838 ± 11	22.683	(-10%)
PHA 50 ug	733 ± 89	24.818	

2. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung	
0	304 ± 93	7.897	
PHA 6,25 ug	415 ± 61	6.924	(-12%)
PHA 25 ug	420 ± 29	5.989	(-24%)
PHA 50 ug	372 ± 22	6.763	(-15%)

3. Untersuchung: nach Knochenmark-Transplantation

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung	
0	382 ± 60	15.749	
PHA 6,25 ug	3.724	14.775	(- 6%)
PHA 25 ug	11.571	10.239	(-35%)
PHA 50 ug	7.212 ± 945	7.580	(-52%)

4. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung	
0	434 ± 61	9.002	
PHA 6,25 ug	1.252 ± 15	8.777	
PHA 25 ug	5.610 ± 782	7.864	(-13%)
PHA 50 ug	6.072 ± 80	6.228	(-31%)

Legende:

Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikator-Zellkulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

Untersuchungsbefunde:

Auf die Stimulation der Lymphozyten mit Mitogenen erfolgte weder eine Blastentransformation noch eine Lymphotoxin-Bildung (Tab. 4.1.7/1 und 2, sowie Abb. 4.1.7/1); diese Befunde entsprechen den beim DiGeorge-Syndrom gefundenen (4.1.4).

Drei Patienten wurden vor und nach versuchter Immunrestitution untersucht: den Patienten vW.M. und K.M. wurde Knochenmark (Univ.-Kinderklinik Ulm), dem Patienten P.R. fetaler Thymus (Dr. Belohradsky, Univ.-Kinderklinik München) transplantiert. Bei den beiden Knochenmark-transplantierten Patienten ließen sich nach der Transplantation Blastentransformation und Lymphotoxin-Sekretion induzieren; eine Normalisierung der Befunde trat jedoch nicht ein. Bei dem (in Ermanglung eines kompatiblen Knochenmarkspenders) Thymus-transplantierten Patienten war eine nur minimale Blastentransformation, jedoch keine Lymphotoxin-Bildung nachweisbar (Tab. 4.1.7/2 und Abb. 4.1.7/1).

4.1.7.1
Graft-versus-Host-Reaktion

Die "graft-versus-host-reaction" (GvHR) ist eine sehr seltene, aber doch mit zunehmender Häufigkeit beobachtete Erkrankung (Zweiterkrankung). Es ist zu erwarten, daß mit zunehmendem Bekanntwerden der Diagnose und der Symptomatik die GvHR in Zukunft noch häufiger diagnostiziert (und verhindert) werden kann.
Für das Zustandekommen einer GvHR oder "Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion" sind zwei Bedingungen erforderlich:

1. Das Transplantat (Spender-Organ) muß immunologisch kompetente und für den Empfänger "allogene" Zellen enthalten und
2. Der Wirt (Empfänger-Organismus) muß immunologisch inkompetent sein.

Anders als bei der besser bekannten "Wirt-gegen Transplantat-Reaktion", der HvGR, also z.B. bei der Abstoßung eines Hauttransplantats oder einer transplantierten Niere, richtet sich bei der GvHR das Transplantat gegen den Wirt. Dieser Prozeß endet für den Wirt häufig letal.

Transplantate, die eine GvHR auslösen können, sind solche, die immunkompetente Zellen enthalten, also Suspensionen von Knochenmarkzellen (Knochenmarktransplantationen), aber auch Bluttransfusionen (Konserven oder materno-fetale Transfusionen). Werden die immunkompetenten, transfundierten Zellen von einem immundefizienten Organismus nicht eliminiert, so siedeln sie sich in den lymphatischen Organen des Wirts an und beginnen zu proliferieren und Strukturen des Wirts zu zerstören.

Vorbedingung für das Entstehen einer GvHR ist eine zelluläre (thymus-abhängige) Immundefizienz. Bei humoralen Immundefekten (z.B. bei der Agammaglobulinämie Typ Bruton) ist das zelluläre Immunsystem soweit intakt, daß eine GvHR nicht auftreten kann.

Tab. 4.1.7/3
Lymphozyten-Funktionen bei schwerer kombinierter Immundefizienz vor und unter einer akuten GvHR

1. Untersuchung: 1 Tag vor Ausbruch der GvHR

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	215 ± 20	8.946
6,25 ug PHA	260 ± 11	8.739 (- 2%)
25 ug PHA	267 ± 21	8.145 (- 9%)
50 ug PHA	177 ± 3	8.669 (- 3%)

2. Untersuchung: 6 Tage nach Ausbruch der GvHR

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	581 ± 14	14.567
6,25 ug PHA	1.469 ± 913	14.209
25 µg PHA	7.999 ± 1972	7.197 (-51%)
50 ug PHA	7.156 ± 1149	5.888 (-60%)

3. Untersuchung: 9 Tage nach Ausbruch der GvHR

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	612	11.185
6,25 ug PHA	-	-
25 ug PHA	6.732	10.722 (- 4%)
50 µg PHA	6.886	7.924 (-29%)

Legende:

Blastentransformation angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozytenkulturen.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikatorzell-Kulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

Klinisch äußert sich die GvHR durch ein morbilliformes Exanthem, Hepatomegalie, Diarrhoe, initial generalisierte Lymphknoten-Schwellung und Splenomegalie, in späteren Stadien der Erkrankung durch Atrophie der lymphatischen Organe und eine Panzytopenie.
Eine GvHR kann entweder akut oder chronisch verlaufen. Die akute Form beginnt in der Regel 7 bis 14 Tage nach der Inokulation der immunkompetenten Zellen (VAN BEKKUM and DE FRIES, 1967), die verzögerte oder chronische Form beginnt gewöhnlich nach drei bis vier Wochen. Verlauf und Beginn der GvHR werden offensichtlich von verschiedenen Faktoren bestimmt, so von der Zelldosis, dem Typ der inokulierten Zellen und der Art der Transplantation.

Der von uns untersuchte Patient mit GvHR (J.L.) litt an einer X-chromosomal vererbten schweren Immundefizienz und entwickelte 8 Tage nach einer Transfusion von 100 ml Frischblut die klinischen Zeichen einer GvHR; er starb 9 Tage später.

Die Reaktion der Lymphozyten auf die Mitogen-Stimulation in vitro vor und während der GvHR sind in Tab. 4.1.7/3 wiedergegeben:
Am Tag vor Ausbruch der GvHR (7 Tage nach der Bluttransfusion) ließen sich die Lymphozyten durch PHA weder zur Blastentransformation noch zur Lymphotoxin-Sekretion stimulieren;
nach Ausbruch der GvHR dagegen reagieren die Zellen auf die Stimulation (vgl. die Ergebnisse der Untersuchungen 1 und 2). Diese Reaktionsfähigkeit der Zellen nahm jedoch innerhalb weniger Tage wieder ab: besonders deutlich wird dies bei einem Vergleich der Lymphotoxin-Aktivität in der 2. und 3. Untersuchung.

4.2 Nicht-klassifizierte Immundefekte

4.2.1 "Isolierter Lymphotoxin-Mangel"

Außer den "klassischen" oder definierten Immundefizienzen gibt es sicherlich zahlreiche noch nicht definierte Immunstörungen, die sporadisch oder familiär auftreten und bisher nicht als Immunstörungen angesehen wurden, weil andere Symptome klinisch im Vordergrund standen oder die üblichen immunologischen Untersuchungen keine pathologischen Befunde zeigten.
Die folgende Beobachtung sei als Beispiel für eine solche Immundefizienz beschrieben.

In einer Familie erkrankten drei Schwestern jeweils im ersten Lebensjahr an fieberhaften Infektionen, Bronchopneumonien und Diarrhoen. Da die Immunglobulin-Titer bei allen Kindern erhöht waren, wurde eine Immundefizienz als Ursache für die Erkrankungen ausgeschlossen. Das erste Kind verstarb im Alter von 6 Wochen an einer Pneumonie, vermutlich verursacht durch Zytomegalie-Virus. Das zweite Kind verstarb im Alter von 2 1/2 Jahren nach 9-monatiger stationärer Krankenhaus-Behandlung; als Todesursache wurde eine kryptogene Sepsis angenommen. Auffällig war bei den beiden Kindern eine extreme Leukozytose und eine so ausgeprägte Eosinophilie, daß die Erkrankung eines der Kinder vorübergehend für eine Eosinophilen-Leukämie gehalten wurde.

Das dritte Kind dieser Familie, ebenfalls ein Mädchen, das wir im Alter von 2 Jahren untersuchten, litt an ähnlichen Erkrankungen, insbesondere häufigen Infektionen. Auch bei diesem Kind ließen sich hohe Immunglobulin-Titer aller drei Haupt-Immunglobulin-Klassen, eine Leukozytose und eine ausgeprägte Eosinophilie nachweisen.

Die in vitro-Lymphozyten-Funktionen dieses Kindes zeigten eine Blastentransformation im Normbereich, jedoch eine völlig fehlende Lymphotoxin-Bildung (Tab. 4.2.1).

Tab. 4.2.1: Lymphozyten-Funktionen bei "Isoliertem Lymphotoxin-Mangel" mit Eosinophilie (Patient: A.M.)

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
-	271 ± 23	1o.545
PHA 6,25 ug	2o.522 ± 1o91	13.o99
PHA 25 ug	31.359 ± 2754	11.o57
PHA 5o ug	32.519 ± 4o	1o.391

Legende:
Blastentransformation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen (Mittelwert ± Standartabweichung).
Lymphotoxin-Bildung angegeben als Mittelwert der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Indikator-Zellkulturen (HeLa).

Wir haben aufgrund dieser Befunde eine zelluläre Immundefizienz mit "isoliertem Lymphotoxin-Mangel" angenommen. Unsere Vermutung, daß ein thymus-abhängiger Immundefekt vorliegen müsse, wurde dadurch bestätigt, daß das Kind 6 Wochen nach der Untersuchung an "toxischen" Varizellen verstorben ist; die Sektion bestätigte den Verdacht weiter: es wurden aplastische lymphatische Organe gefunden.

4.2.2 Intestinale Lymphangiektasie

Als "Intestinale Lymphangiektasie" bezeichnet man eine pathologische Erweiterung der Lymphgefäße mit Lymph-Stau im Darmtrakt. Diese Störung kann angeboren oder erworben sein, eine Ursache läßt sich nur selten finden. Oft wird die Intestinale Lymphangiektasie mit Ektasien der Lymphgefäße auch anderer Organe beobachtet.

Der Lymph-Stau im Darmtrakt führt zu einem Verlust von Proteinen und Lymphozyten in das Darmlumen und (in 45% der Fälle) zur Entwicklung eines chylösen Aszites.

Klinisch äußert sich die Erkrankung, die zur Gruppe der Enteropathien mit Protein-Verlust gerechnet wird, durch Ödeme, Hypoproteinämie und Lymphozytopenie (WALDMANN et al., 1961; WILKINSON et al., 1965; MISTILIS et al., 1965; HERSKOVIC et al., 1967; WALDMANN et al., 1975).

Die Immunstörungen, die mit der Intestinalen Lymphangiektasie einhergehen, sind bedingt durch die Hypogammaglobulinämie (humorale Immundefizienz) und die Lymphozytopenie (zelluläre Immundefizienz); letztere läßt sich durch Haut-Anergie vom Spät-Typ, verzögerte oder fehlende Abstoßung von allogenen Haut-Transplantaten und durch defekte Lymphozyten-Funktionen in vitro nachweisen (STROBER et al., 1967; WEIDEN et al., 1972).

Durch den chronischen Verlust von Lymphozyten in das Darmlumen gehen den Patienten mit Intestinaler Lymphangiektasie vor allem die rezirkulierenden und langlebigen Lymphozyten verloren (WALDMANN et al., 1975).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatte unser Patient mit Intestinaler Lymphangiektasie 11.000 Leukozyten/ul Blut, davon 11% Lymphozyten. Die Zellen ließen sich weder zur Blastentransformation, noch zur Lymphotoxin-Bildung stimulieren (Tab. 4.2.2). Um auszuschließen, daß der relativ große Anteil an nicht-lymphozytären Zellen (89%) einen hemmenden Einfluß auf die Lymphozyten-Funktionen ausübt, wurden außer einer gesunden Kontrollperson auch ein weiterer Patient mit einer Lymphozytopenie (9% Lymphozyten) untersucht:
Die Anwesenheit von mehr als 90% nicht-lymphozytärer Zellen in den Kulturen hatte auf die Lymphotoxin-Sekretion keinen hemmenden Einfluß. Das Nicht-Ansprechen der Lymphozyten des Patienten mit Intestinaler Lymphangiektasie muß also dadurch bedingt sein, daß die Zellen auf das Mitogen nicht reagieren können.
Die Lymphotoxin sezernierenden Lymphozyten gehören also zu den rezirkulierenden (das sind die die Blutbahn verlassenden und in die Lymphbahnen gelangenden) und langlebigen Lymphozyten, zu denen die thymus-abhängigen Lymphozyten gerechnet werden.

Tab. 4.2.2
Lymphozyten-Funktionen bei Intestinaler Lymphangiektasie (Pat. E.L.)

1. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
-	244	16.892
PHA 5o ug	217	18.457

2. Untersuchung

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung	
Patient			
-	59o	13.762	
PHA 5o ug	31o	12.699	(- 8%)
1. Kontrollperson			
-	342 ± 62	14.5o1	
PHA 5o ug	152.196 ± 1o.593	2.716	(-81%)
2. Kontrollperson			
-	191 ± 6	13.318	
PHA 5o ug	28.925 ± 4.93o	1.63o	(-88%)

Legende:

Blastentransformation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen. Wegen der Lymphopenie konnten bei dem Patienten nur Einfach-Kulturen angesetzt werden; Kontrollperson 1: Mittelwert ± Standardabweichung; Kontrollperson 2: Mittelwert aus Doppelbestimmungen ± Abweichung.

Lymphotoxin-Bildung angegeben in % Hemmung, errechnet aus dem Mittelwert der cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Indikator-Zellkulturen (HeLa).

Bei der 2. Kontrollperson handelt es sich um einen Patienten mit Lymphopenie (9%).

4.2.3 Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE)

Die SSPE ist eine degenerative Erkrankung des Zentralnervensystems, die vorwiegend Kinder im Schulalter befällt. Die Krankheitssymptome wie Änderung der Persönlichkeitsstruktur, Demenzentwicklung, zerebrale Krampfanfälle und Myoklonien nehmen rasch an Intensität zu. Meist sterben die Patienten einige Monate bis wenige Jahre nach Auftreten der Erkrankung.

Pathologisch-anatomisch lassen sich in den Hirnzellen der Patienten intranukleäre und intraplasmatische Einschlüsse nachweisen, die sich elektronenmikroskopisch als Paramyxo-Viren-ähnliche Strukturen identifizieren ließen (BOUTEILLE et al., 1965).
1967 berichtete CONNOLLY et al. über ungewöhnlich hohe Masern-Antikörper-Titer sowohl im Serum als auch im Liquor von SSPE-Patienten.
Seit durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen Masern-Virus-Antigen in den infizierten Hirnabschnitten nachgewiesen (FREEMAN et al., 1967) und durch Ko-Kultivierungs-Studien Masern-Viren isoliert werden konnten (HORTA-BARBOSA et al., 1969), wird die Erkrankung als eine Spät-Komplikation der Masern angesehen und zu den "slow-virus"-Infektionen gerechnet.

Während somit die (Erreger-) Ätiologie der SSPE geklärt ist, besteht immer noch Unklarheit darüber, weshalb bei einigen wenigen Kindern das Masern-Virus im Organismus zu persistieren und eine SSPE auszulösen vermag.
Es kann angenommen werden, daß Immunreaktionen in irgendeiner Weise die Pathogenese der Erkrankung mitbestimmen (TER MEULEN et al., 1972).
Humorale Immundefizienzen scheiden als Ursache für die Erkrankung mit großer Wahrscheinlichkeit aus: Patienten mit SSPE können Masern-Antikörper von oft sehr hoher Titerhöhe bilden (CONNOLLY et al., 1967) und andererseits liegen keine Beobachtungen darüber vor, daß Kinder mit Agammaglobulinämien bevorzugt an SSPE erkranken; Patienten mit Agammaglobulinämien können sich von einer Masern-Infektion völlig erholen, ohne Antikörper gebildet zu haben.

Diese Beobachtung zeigt an, daß bei der Abwehr der Masern und der Eliminierung des Virus in erster Linie das zelluläre Immunsystem beteiligt ist. Wenn dieses Immunsystem, so kann man vermuten, defekt ist, könnte die Virus-Eliminierung nicht vollständig sein und eine progressive Virus-Erkrankung resultieren (KRETH et al., 1974). Die SSPE müßte also gehäuft auftreten bei Patienten mit T-Zell-Defekten. Dies ist aber offensichtlich nicht der Fall, da bisher über keinen Patienten mit einem primären T-Zell-Defekt berichtet wurde, der an SSPE erkrankte. Dies könnte man sich dadurch erklären, daß Patienten mit schweren T-Zell-Defekten nur eine minimale Chance haben, eine akute Masern-Infektion zu überleben, oder dadurch, daß Patienten mit SSPE einen T-Zell-Defekt unter der akuten Masern-Infektion erst erwerben und behalten (BURNET, 1968) und zwar dadurch, daß das Masern-Virus im Thymus persistiert und eine spezifische Reaktions-Unfähigkeit der T-Zellen dem Masern-Antigen gegenüber hervorruft.

In der Literatur herrscht keine Klarheit darüber, ob Patienten mit SSPE zelluläre Immunstörungen haben; mit wenigen Ausnahmen (GERSON et al., 1971; KOLAR, 1968) wird über keine systemischen T-Zell-Defekte bei Patienten mit SSPE berichtet. Interessant ist jedoch, daß im Gegensatz zu den in vitro-Untersuchungen immer wieder von gestörten in vivo-Reaktionen (Anergie nach Hauttestungen vom Spät-Typ) berichtet wird (KRETH et al., 1974).

Da wir bei den Patienten mit definierten Immundefizienzen eine enge Korrelation zwischen der Anergie bei Hautreaktionen vom Spät-Typ und einer gestörten Lymphotoxin-Sekretion beobachten konnten, haben wir bei Kindern mit SSPE die Lymphotoxin-Sekretion genauer untersucht. Wenn die häufig zu beobachtende Anergie der SSPE-Patienten Ausdruck einer zellulären Immunstörung ist, müssen wir eine verminderte Lymphotoxin-Sekretion der Lymphozyten von Patienten mit SSPE erwarten.

Tab. 4.2.3 gibt die Untersuchungen bei SSPE-Patienten wieder: Untersucht wurden insgesamt vier Patienten, die meisten mehrmals. In den Dosis-Wirkungs-Untersuchungen fiel auf, daß in der Mehrzahl der Untersuchungen eine nur schwache Reaktion der Lymphozyten in der Blastentransformation nachgewiesen werden konnte und daß drei der Patienten eine pathologisch verminderte und ein Patient eine niedrig-normale Lymphotoxin-Sekretion zeigte.

Diese Befunde sprechen für eine partielle zelluläre Immundefizienz bei Patienten mit SSPE; sie lassen jedoch noch keine Differenzierung zwischen einer primären und einer sekundären (durch die Masern-Infektion oder die sich im Anschluß an die Masern entwickelnde slow-virus-Infektion) Immundefizienz zu.

Tab. 4.2.3/1
Lymphozyten-Funktionen bei Patienten mit SSPE

Patient Z.E.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
1. Untersuchung		
0	88 ± 8	23.188
PHA 6,25 µg	4.266 ± 399	25.485 (-10%)
PHA 25 µg	34.284 ± 4109	18.975 (-18%)
PHA 50 µg	40.013 ± 4790	12.361 (-47%)
2. Untersuchung		
0	205 ± 39	13.840
PHA 6,25 µg	54.689 ± 5758	9.943 (-29%)
PHA 25 µg	47.471 ± 4460	7.778 (-43%)
PHA 50 µg	37.727 ± 2578	6.788 (-51%)

Patient M.A.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
1. Untersuchung		
0	566 ± 44	11.768
PHA 6,25 µg	5.074 ± 632	10.738 (- 9%)
PHA 25 µg	16.165 ± 1219	9.752 (-17%)
PHA 50 µg	21.147 ± 4713	9.011 (-24%)
2. Untersuchung		
0	485 ± 24	4.376
PHA 6,25 µg	20.300 ± 1029	4.996
PHA 25 µg	40.421 ± 4445	3.791 (-13%)
PHA 50 µg	20.720 ± 1243	3.177 (-17%)

Patient D.M.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
0	475 ± 45	17.641
PHA 6,25 µg	73.121 ± 6192	7.758 (-56%)
PHA 25 µg	146.418 ± 2647	7.944 (-55%)
PHA 50 µg	76.011 ± 3052	7.525 (-57%)

Tab. 4.2.3/2
Lymphozyten-Funktionen eines Patienten mit SSPE

Patient W.W.

Stimulans	Blastentransformation	Lymphotoxin-Bildung
1. Untersuchung		
0	352 ± 24	10.252
PHA 6,25 µg	8.600 ± 2141	9.544 (- 7%)
PHA 25 µg	21.580 ± 1016	5.963 (-42%)
PHA 50 µg	14.441 ± 1091	4.266 (-58%)
2. Untersuchung		
0	325 ± 125	11.660
PHA 6,25 µg	5.802 ± 539	10.896 (- 7%)
PHA 25 µg	32.105 ± 3125	8.066 (-31%)
PHA 50 µg	20.831 ± 4589	6.058 (-48%)
3. Untersuchung		
0	215 ± 35	15.319
PHA 6,25 µg	9.490 ± 3715	14.296 (- 7%)
PHA 25 µg	32.375 ± 7747	9.255 (-40%)
PHA 50 µg	31.572 ± 537	8.947 (-42%)
4. Untersuchung		
0	137 ± 24	7.492
PHA 6,25 µg	3.289 ± --	7.713
PHA 25 µg	41.013 ± 1499	4.052 (-46%)
PHA 50 µg	---	--

Legende:

Blastentransformation angegeben in cpm 3H-Thymidin-Aufnahme in Leukozyten-Kulturen

Lymphotoxin-Bildung angegeben in cpm 3H-Thymidin-Einbau in Indikator-Zellkulturen (HeLa) bzw. Prozent Hemmung.

5. Diskussion

Für die Diagnostik zellulärer Immundefizienzen hat sich die in vitro Stimulation von Lymphozyten als ein wichtiges Hilfsmittel erwiesen.

Üblicherweise wird die durch die Stimulation induzierte Blastentransformation (als DNS-Synthese) bestimmt und als Parameter für die zelluläre Immunkompetenz angesehen. Die Stärke der Blastentransformation ist jedoch erheblichen Schwankungen unterworfen, deren Ursache immer noch nicht völlig bekannt ist. Zu diskutieren sind:

1. unterschiedliche in vitro-Kulturbedingungen (Seren, Medien) aber auch
2. Veränderungen in der Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten nach Isolierung aus dem Blut (Verschiebung in der Lymphozyten-Subpopulation mit einem wechselnd hohen Anteil an reaktionsfähigen Zellen).

Wegen der großen Streubreite der "Normalwerte" der DNS-Synthese (s. Tab. 3.1.1/1) und der unterschiedlichen Optimaldosen der Mitogene für Patienten und Gesunde (s. Untersuchungen beim Wiskott-Aldrich-Syndrom, Abschnitt 4.1.6) kann für die Stärke der Blastentransformation stimulierter Lymphozyten kein gesicherter Normalbereich ermittelt werden.

In dieser Arbeit wurde versucht, eine besser reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Reaktionsfähigkeit von Lymphozyten zu suchen. Dazu schien uns die Bestimmung der Lymphotoxin-Sekretion stimulierter Lymphozyten aus vier Gründen besonders geeignet:

1. Die Produktion der Lymphokine, zu denen auch das Lymphotoxin gehört, ist ein kontinuierlicher Prozeß und die Bestimmung der Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. nach drei Tagen) gibt die akkumulierte Aktivität dieser Lymphozyten-Funktion während der gesamten Inkubation wieder (GRANGER , 1969).

2. Die Lymphotoxin-Aktivität einer bestimmten Person schwankt erheblich weniger als die Blastentransformation. So haben wir bei ein und demselben Probanden Schwankungen der Blastentransformation zwischen 14.000 und 132.000 cpm beobachtet, also eine Steigerung um das 9-fache. Im Gegensatz dazu weicht die Lymphotoxin-Aktivität nur gering vom Mittelwert ab (s. Abschnitt 3.1.1).

3. Die Messung der Blastentransformation ist nur sinnvoll, wenn Dosis-Wirkungsuntersuchungen gemacht werden. Störungen der Lymphotoxin-Sekretion lassen sich dagegen bereits bei Verwendung nur einer Dosis reproduzierbar erkennen (s. Kapitel 4.1.6).

4. Durch die Bestimmung der Blastentransformation allein kann ein zellulärer Immundefekt übersehen werden: Bei dem Patienten mit "isoliertem Lymphotoxin-Mangel" und klinisch einwandfrei nachweisbarer schwerer zellulärer Immundefizienz wurde in der Blastentransformation kein pathologischer Wert gemessen, eine Lymphotoxin-Produktion war jedoch nicht nachweisbar (s. Kapitel 4.2.1).

Um zu prüfen, ob Störungen der Lymphotoxin-Sekretion Auskunft über den zellulären Immunstatus eines Patienten geben können, haben wir in dieser Studie durch

vergleichende in vivo- und in vitro-Beobachtungen bei verschiedenen Patienten mit Immundefekten Art und Ausmaß zellulärer Immunstörungen mit fehlender oder verminderter Lymphotoxin-Sekretion zu korrelieren versucht (s. Tab. 5.1).

Die definierten Immundefizienzen werden heute entsprechend der Klassifikation der WHO (FUDENBERG et al., 1971) unterteilt in solche mit vermutetem "T-Zell", "B-Zell" oder in solche mit kombiniertem "T- und B-Zell"-Defekten (s. Tab. 5.1).

Lymphozyten von Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz (Abschnitt 4.1.7) lassen sich nicht zur Lymphotoxin-Sekretion stimulieren. Aus diesen Befunden kann jedoch nicht geschlossen werden, daß die Lymphotoxin-Bildung ein Parameter zellulärer Immunkompetenz ist, da sowohl die humorale wie auch die zelluläre Immunstörung bei dieser Erkrankung Ursache der fehlenden Lymphotoxin-Sekretion sein kann. Die Schlußfolgerung kann man erst aufgrund der Befunde bei "reinen" zellulären und humoralen Immundefizienzen ziehen: isolierte zelluläre Immundefizienzen wie das DiGeorge' Syndrom gehen mit fehlender oder deutlich verminderter Lymphotoxin-Sekretion, isolierte humorale Immundefizienzen dagegen wie die Agammaglobulinämie vom Typ Bruton mit normaler Lymphotoxin-Sekretion einher (vgl. die Abschnitte 4.1.4, und 4.1.1).

Die in vivo bestehende enge Vernetzung und Kooperation der Immunsysteme erlaubt jedoch nicht ohne weiteres die Annahme, daß eine Einschränkung der Lymphotoxin-Sekretion auf Thymusdysfunktionen zurückgeht; diesen Schluß erlauben erst einige weitere klinische Beobachtungen dieser Studie:

Der Patient mit "isoliertem Lymphotoxin-Mangel und Eosinophilie" (Abschnitt 4.2.1), der hohe Serum-Immunglobulin-Titer hatte, erlag einer Varizellen-Infektion. Seine beiden Geschwister starben ebenfalls an Infektionen.
Ein Bruder des Patienten mit der X-chromosomal vererbten Immundefizienz mit Hyper-IgM (Abschnitt 4.1.3) verstarb an Varizellen; in vitro-Untersuchungen des Patienten ergaben eine normale Blastentransformation, eine normale E-Rosetten-Bildung, aber eine fehlende Lymphotoxin-Sekretion.
Ohne Kenntnis der Familienanamnese und der Bestimmung der Lymphotoxin-Aktivität wäre der (familiäre) zelluläre Immundefekt beider Patienten übersehen worden.

Aufgrund dieser Beobachtungen nehmen wir an, daß die Lymphotoxin-Bildung - nach Stimulation mit Phytohämagglutinin - ein verläßlicher Maßstab für die zelluläre Immunkompetenz eines Individuums ist. Ist dies der Fall, müssen einige der bisher als "rein" humorale Immundefekte beschriebene Erkrankungen als kombinierte Immunstörungen angesehen werden. Dies beträfe die X-chromosomal vererbte Immundefizienz mit Hyper-IgM (siehe oben), aber auch den selektiven IgA-Mangel, der von der WHO den "reinen" B-Zell Defekten zugeordnet wird. In der von uns untersuchten Familie mit selektivem IgA-Mangel war bei allen Geschwistern die Lymphotoxin-Sekretion gestört (s. Abschnitt 4.1.2).

Tab. 5.1
Pathogenetische Einteilung der untersuchten Immundefekte entsprechend der Klassifikation der WHO von 1971 (GOODER et al., 1971)
im Vergleich dazu die Ergebnisse von Blastentransformation und Lymphotoxin-Bildung in PHA-stimulierten Leukozyten-Kulturen

Typ	vermuteter Zell-Defekt			Blasten-transformation	Lymphotoxin-Bildung
	B-Zellen	T-Zellen	Stamm-Zellen		
Infantile X-chromosomale Agammaglobulinämie (Bruton)	+			n	n
Selektiver IgA-Mangel	+			n	f
X-chromosomal vererbte Immundefizienz mit Hyper-IgM	+	?		n	vv
Thymusaplasie (DiGeorge Syndrom)		+		f	f
Immundefizienz mit Ataxia teleangiectatica	+	+		f	vv
Immundefizienz mit Thrombopenie und Ekzem (Wiskott-Aldrich-Syndrom)	+	+		(n)	v
Schwere kombinierte Immundefizienz	+	+	+	f	f

n = normal, v = vermindert, vv = stark vermindert, f = fehlend (vergleiche 2.2.5)

Die zelluläre Immundefizienz bei der Ataxia teleangiectatica ist nach Angaben in der Literatur bei verschiedenen Patienten verschieden stark ausgeprägt. Die Lymphozyten des von uns untersuchten Patienten zeigten kaum eine Reaktion auf PHA-Stimulation (Blastentransformation fehlend, Lymphotoxin-Sekretion stark vermindert) (vgl. Tab. 4.1.5).

Zelluläre Immunstörungen sind auch ein wesentliches Merkmal des Wiskott-Aldrich Syndroms; ihr Nachweis durch in vitro-Untersuchungen stößt jedoch häufig auf Schwierigkeiten: so sind über die Stimulierbarkeit der Lymphozyten mit PHA von verschiedenen Arbeitsgruppen, aber auch in Publikationen derselben Arbeitsgruppe widersprüchliche Ergebnisse mitgeteilt worden (COOPER et al., 1968; OPPENHEIM et al., 197o; ALTMANN et al., 1974; OPPENHEIM et al., 1973; SHERWOOD and BLAESE, 1973; BLAESE et al., 1975).

Die widersprüchlichen Untersuchungsbefunde könnten mit einer unterschiedlichen Ausprägung der Immundefizienz bei verschiedenen Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom zusammenhängen; sie könnten jedoch auch - und das erscheint uns wahrscheinlicher - bedingt sein durch Unterschiede in den Untersuchungstechniken und durch Schwierigkeiten in der Interpretation der Befunde. Zu dieser Annahme veranlaßt uns ein Bericht von OPPENHEIM et al. (1973), in dem eine dissoziierte Störung der Lymphozyten-Funktionen bei Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom beschrieben wird: zur Blastentransformation ließen sich die Lymphozyten der Patienten durch spezifische Antigene und durch die Mitogene PWM und ConA nicht normal stimulieren, wohl aber durch das Mitogen PHA; die Lymphotoxin-Sekretion wurde als normal beurteilt. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu unseren Untersuchungen bei 6 Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom, die alle eine defekte Lymphotoxin-Bildung und eine in Dosis-Wirkungs-Studien erkennbare Störung der Blastentransformation hatten.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen beim Wiskott-Aldrich Syndrom wurde von einigen Autoren darauf hingewiesen, daß vergleichend mit optimalen und suboptimalen Mitogen-Dosen stimuliert werden sollte (OPPENHEIM et al., 197o). "Optimale" und "suboptimale" Dosen lassen sich jedoch nicht ohne weiteres festlegen:

1. PHA-Dosen, die zu maximaler Blastentransformation (DNS-Synthese) führen, sind nicht identisch mit Dosen, die zu maximaler Lymphotoxin-Sekretion führen. Es läßt sich also bereits bei der Bestimmung der Reaktionsfähigkeit normaler Lymphozyten eine für alle Funktionen optimal stimulierende Dosis nicht finden.
2. PHA-Dosen, auf die Lymphozyten von Gesunden mit maximaler Blastentransformation reagieren, reichen nicht aus, um Lymphozyten von Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom zu stimulieren, und PHA-Dosen, auf die Lymphozyten der Patienten maximal reagieren, suprimieren bereits die Blastentransformation der Lymphozyten Gesunder (Abb. 4.1.6/2 und 4.1.6/3).

Die Bestimmung der Blastentransformation in PHA-stimulierten Leukozyten-Kulturen kann deshalb zur Diagnostik einer zellulären Immundefizienz beim Wiskott-Aldrich Syndrom nur dann zu verwertbaren Ergebnissen führen, wenn - wie von OPPENHEIM et al. (197o) diskutiert - die Zellen auch mit niedrigen Dosen PHA stimuliert, also Dosis-Wirkungs-Studien durchgeführt werden.

Im Gegensatz zur Blastentransformation war die Lymphotoxin-Bildung bei allen 6 Patienten unserer Studie - unabhängig von der stimulierenden PHA-Dosis - vermindert (Abb. 4.1.6/4, Tab. 4.1.6./2 und 4.1.6/3). Die Diskrepanz dieser Befunde zu denen von OPPENHEIM et al. (1973) läßt sich durch methodische Unterschiede erklären: die Autoren verwenden Makro-

kulturen mit 5x höherer Lymphozytenzahl; geht man davon aus, daß die Lymphotoxin-Bildung entsprechend höher ist, kann man erwarten, daß die verminderte, aber nie völlig fehlende Lymphotoxin-Sekretion der Lymphozyten der Patienten zu zytotoxischen Aktivitäten führt, die in den oberen Grenzbereich des Lymphotoxin-Tests kommen (s. Kapitel 3.2). Erst eine Titration der Lymphotoxin-Präparationen und Bestimmung der Aktivität in Einheiten, läßt die Unterschiede zwischen Gesunden und Wiskott-Aldrich Patienten in der Lymphotoxin-Sekretion erkennen (Abb. 3.2.1/6 und Tab. 4.1.6/2).

Von den 6 von uns untersuchten Patienten mit Wiskott-Aldrich Syndrom (4.1.6) litten 5 an rezidivierenden Infektionen; nur einer (Patient L.T.) war nie ernstlich an Infektionen erkrankt. Interessant ist, daß dieser Patient eine nahezu normale Lymphotoxin-Sekretion hatte.
Patienten mit zellulären Immunstörungen leiden häufig unter Infektionen. Da Infektionen ihrerseits zu einer Verminderung der Lymphotoxin-Sekretion führen, könnten Störungen der Lymphotoxin-Sekretion bei Patienten mit Immundefekten und rezidivierenden Infektionen nicht primär, sondern sekundär (durch die Infektionen) bedingt sein.

Diese Annahme halten wir deshalb für unwahrscheinlich, weil

1. die meisten der Patienten zu den Untersuchungszeiten klinisch infektfrei waren
2. im Rahmen anderer Untersuchungen (EIFE und TAVERA, unveröffentlicht) zahlreiche Patienten mit schweren Infektionen, jedoch ohne definierte Immundefizienz, normale Lymphotoxin-Bildung zeigten und
3. eine Infektion bei sonst gesunden Personen nicht nur eine geringe Verminderung, sondern auch eine deutlich überschießende Reaktion der Lymphotoxin-Sekretion bewirken kann (s. Abb. 3.1.1); bei keinem der wiederholt untersuchten Patienten haben wir eine ähnliche Beobachtung machen können.

In der Literatur herrscht keine Klarheit darüber, ob bei Kindern mit SSPE zelluläre Immunstörungen vorliegen. Im Gegensatz zu den normalen in vitro-Funktionsuntersuchungen bei diesen Patienten werden jedoch immer wieder gestörte in vivo Reaktionen (Allergie nach Hauttestung vom Spättyp) berichtet (KRETH et al., 1974). Objektiv nachweisen läßt sich die partielle Immundefizienz der Patienten mit SSPE offensichtlich durch die Bestimmung der Lymphotoxin-Sekretion, die bei drei unserer Patienten erheblich, bei einem mäßig beeinträchtigt war. Diese Befunde sprechen für eine partielle zelluläre Immundefizienz beim Patienten mit SSPE; sie lassen jedoch keine Differenzierung zwischen einer primären und einer sekundären (durch die Maserninfektion oder die sich im Anschluß an die Masern entwickelnde slow virus infection) Immundefizienz zu.

Durch die Bestimmung der Lymphozytenfunktionen in vitro ergibt sich auch die Möglichkeit, eine Immunrestitution zu überwachen. Bei schwerem kombiniertem Immundefekt (s. 4.1.7) kam es nach Knochenmarks-Transplantation zu einer meßbaren Reaktion der Lymphozyten. Weder die Blastentransformation noch die Lymphotoxin-Sekretion erreichten jedoch normale Werte.
Nach Übertragung vom fetalen Thymus (Patientin P.R.) war bei einmaliger Kontrolluntersuchung eine Verbesserung der Reaktionen nicht zu verzeichnen gewesen.

Anhand dieser Befunde läßt sich deutlich machen, daß für die Diagnostik partieller zellulärer Immunstörungen die Bestimmung der Mediator- oder Lymphokine-Bildung eine wertvolle Hilfe ist, und daß sich auch für das Lymphotoxin die Vermutung von PICK und TURK (1972) zu bestätigen scheint, nach der die Mediator-Bildung ein besseres Korrelat zellulärer Immunreaktionen ist, als die Blastentransformation, deren Störung oft nur diskret in Dosis-Wirkungs-Studien erkannt werden kann.

Zusammenfassung

Als Methoden zellulärer Immundiagnostik werden in dieser Arbeit die "PHA-induzierte Lymphozytenblastentransformation" und die Sekretion von "Lymphotoxin", einer Effektorsubstanz stimulierter Lymphozyten bestimmt.

Um Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methoden zu prüfen, werden die Ergebnisse einer im Zeitraum von 21 Monaten 14 mal getesteten sowie die einer zweiten im Zeitraum von 6 Wochen 10 mal getesteten Kontrollperson zusammengestellt.
Es zeigt sich, daß die Blastentransformation ein und derselben Kontrollperson auch bei Untersuchungen in kurzen Abständen eine extrem große Streuung aufweist und somit nur einen groben Anhalt für die Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten eines Probanden geben kann.

Im Gegensatz dazu liefern die Lymphotoxin-Hemmwerte nach Stimulation mit PHA-Dosen (>6,25 µg/200.000 Lymphozyten) auch über einen langen Beobachtungszeitraum reproduzierbare Ergebnisse.

Um zu prüfen, ob Störungen der Lymphotoxin-Sekretion und Blastentransformation Auskunft über den zellulären Immunstatus eines Patienten geben können, haben wir Art und Ausmaß zellulärer Immunstörungen mit fehlender oder verminderter Lymphotoxin-Sekretion und Blastentransformation zu korrelieren versucht (Tab. 5.1).

Insgesamt konnten 17 Kinder mit definierten Immundefekten und weitere 6 Kinder mit nicht-klassifizierten Immundefekten untersucht werden.

Patienten mit "reinen B-Zell-Defekten",wie der infantilen X-chromosomal vererbten Agammaglublinämie Typ Bruton sezernieren normale Mengen von Lymphotoxin; Patienten mit reinen "T-Zell-Defekten", wie der Thymusaplasie (DiGeorge Syndrom) oder mit schweren kombinierten Immundefizienzen dagegen lassen sich nicht zur Lymphotoxin-Produktion stimulieren. Herabgesetzt ist die Fähigkeit zur Lymphotoxin-Bildung bei Patienten mit anderen kombinierten Immundefekten, wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom und der Ataxia teleangiectatica. Es ergibt sich somit eine Korrelation zwischen gestörter Lymphotoxin-Bildung und zellulärer (Thymusabhängiger) Immundefizienz.

Die Lymphotoxin-Sekretion zeigt sich aber auch als gestört bei Erkrankungen, die bisher vorwiegend als humorale Immundefizienz angesehen wurden, so beim selektiven IgA-Mangel und bei der X-chromosomal vererbten Immundefizienz mit Hyper-IgM. Wir schließen aus diesen Untersuchungen, daß auch diesen sog. "Dysgammaglobulinämien" kombinierte Immunstörungen zugrundeliegen, deren zelluläre Komponente nur durch empfindliche Methoden, wie der Bestimmung der Lymphotoxin-Bildung, nachgewiesen werden kann.

Unter den Patienten mit nicht-klassifizierten Immunstörungen fanden wir ein Kind mit "selektivem Lymphotoxin-Mangel", dessen humorales Immunsystem intakt war (hohe Immunglobulin-Serum-Titer) und dessen zelluläre Immundefizienz sich - bei normaler Blastentransformation - lediglich in einer fehlenden Lymphotoxin-Bildung äußerte. Eine letal verlaufende Varizellen-Infektion dieses Kindes beweist die zelluläre Immundefizienz.

Anhand dieser Befunde läßt sich deutlich machen, daß für die Diagnostik partieller zellulärer Immunstörungen die PHA-induzierte Lymphotoxin-Sekretion eine wertvolle Hilfe ist, da sie ein empfindliches Korrelat zellulärer Immunstörungen ist und sich mit einer reproduzierbaren, praktikablen Untersuchungsmethode nachweisen läßt.

7 Literaturverzeichnis

ALDRICH, R.A.; STEINBERG, A.G.; CAMBELL, D.C.:
Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and blood diarrhea.
Pediatrics 13: 133-139, 1954

ALTMANN, L.C.; SNYDERMAN, R.; BLAESE, R.M.:
Abnormalities of chemotactic lymphokine syntheses an mononuc'ear leukocyte chemotaxis in Wiskott-Aldrich-Syndrome.
J. Clin. Invest. 54: 486-493, 1974

AMMANN, A.J. and FUDENBERG, H.H.:
Immunodeficiency diseases.
In: Basic and Clinical Immunology.
Edited by H.H. FUDENBERG, D.P. STITES, J.L. CALDWELL, J.V. WELLS, pp. 333-359
Lange Medical Publications, Los Altos, California, 1976

VAN BEKKUM, D.W.; DE VRIES, M.J.; VONDERWA, D.:
Lesions characteristic of secondary disease in serum free heterologous radiation chimeras.
J. Nat. Canc. 38: 223-231, 1967

BELOHRADSKY, B.H.; GRISCELLI, C., FUDENBERG, H.H., MARGET, W.:
Das Wiskott-Aldrich-Syndrom.
Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk. 41: 85-184, 1978

BERGSMA, D.; MC KUSICK, F.A.:
Immunologic Deficiency Diseases in Man.
Birth Defects. Orig. Art. Ser. IV (1)
White Plains, N.Y., The National Foundation, 1968

BERGSMA, D.; GOOD, R.A.; FINSTAD, J. (edit.)
Immunodeficiency in Man and Animals.
Birth Defects. Orig. Art. Ser. XI (1), 1975

BIGGAR, W.D. and GOOD, R.A.:
Immunodeficiency in ataxia teleangiectasia.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. XI, 1: 271-276, 1975

BLAESE, R.M.; STROBER, W.; WALDMANN, T.A.:
Immunodeficiency in Wiskott-Aldrich-Syndrome.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. XI, 1: 25o-254, 1975

BLAESE, R.M.; STROBER, W.; BROWN, R.S.; WALDMANN, T.A.:
The Wiskott-Aldrich-Syndrome, a disorder with a possible defect in antigen and recognition.
Lancet i, 1o56-1o6o, 1968

BODER, E. and SEDGWICK, R.P.:
Ataxia-Teleangiectasia. A familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous teleangiectasia and frequent pulmonary infection.
Pediatrics 21: 526-554, 1958

BOUTEILLE, M.; FONTAINE, C.; VEDRENNE, C.L.; DELANUE, J.:
Sur un cas d'encéphalite sub-aigue á inclusions: étude anatomo-clinique et ultrastructurale.
Prev. neurol. 113: 454, 1965

BRUTON, O.C.:
Agammaglobulinemia
Pediatrics 9: 722-728 , 1952

BURNET, F.M.:
Measles as an index of immunological function.
Lancet ii: 61o-613, 1968

CONNOLLY, J.H.; ALLEN, J.V.; HURWITH, L.J.; MILLAR, J.H.:
Measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panenzephalitis.
Lancet i: 542-544, 1967

COOPER, M.D., CHASE, P.H., LOWMAN, J.T., KRIVIT, W.; GOOD, R.A.:
Immunologic defects in patients with Wiskott-Aldrich-Syndrome.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. IV, 1: 378-387, 1968

COOPERBAND, S.R.; ROSEN, F.S.; KIBRICK, S.:
Studies on the in vitro behavior of agammaglobulinemia lymphocytes.
J. Clin. Invest. 47: 836-847 , 1968

DiGEORGE, A.M.:
Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences:
Concurrence with congenital hypoparathyreoidism.
Immunologic Deficiency Disease in Man.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. IV, 1: 116-121, 1968

EIFE, R. and AUGUST, C.:
Detection of lymphotoxin produced in mixed lymphocyte cultures (MLC):
Variation of target cell sensivity.
Cell. Immunol. 9: 163-168, 1973

EIFE, R.; EIFE, G.; AUGUST, C.; KUHRE, W.; STÄHR-JOHANSEN, K.:
Lymphotoxin production and blast cell transformation by cord blood lymphocytes:
Dissociated function in newborn infants.
Cell. Immunol. 14: 435-442, 1974

EIFE, R.; KOPECKY, M.; LAU, B.; JANKA, G.; HAAS, R.; LAMPERT, F.:
In vitro function of lymphoid cells in untreated childhood acute lymphoblastic leukemia.
In: Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas. Thierfelder, Rodt, Thiel, eds.
Springer, Berlin, 2o9-213, 1977

EISEN, A.H.; KARPATI, G.; LASZIO, T.; ANDERMANN, F.; ROBB, J.P.; BACAL, H.L.:
Immunologic deficiency in Ataxia teleangiectasia.
New Engl. J. Med. 272: 18-22 , 1965

EPSTEIN, W.L.; FUDENBERG, H.H.; REED, W.B.; BADER, E.; SEDGWICK, R.P.:
Immunologic studies in ataxia teleangiectasia:
I. Delayed hypersensivity and serum immunglobulin levels in probands and first degree relatives.
Int. Arch. Allerg. 3o: 15-29 , 1966

EPSTEIN, L.B.:
The comparative biology of immune and classical interferons.
In: Biology of Lymphokines.
Edited by S. COHEN, E. PICK, J.J. OPPENHEIM
Academic Press, London, 443-514, 1979

FREEMAN, J.M.:
The clinical spectrum of early diagnosis of Dawson's encephalitis.
J. Pediat. 75: 59o-6o3, 1969

FUDENBERG, H.; GOOD, R.A.; GOODMAN, H.C.; HITZIG, W.; KUNKEL, H.G., ROITT, J.M.; ROSEN, F.S.; ROWE, D.S.; SELIGMANN, M.; SOOTHILL, J.R.:
Primary immunodeficiencies.
Pediatrics 47: 927-946, 1971

GELFAND, E.W.; BIGGAR, W.D.; ORANGE, R.P.:
Immune Deficiency: Evaluation, Diagnosis and Therapy.
In: The Pediatric Clinics of North America
21 (4), 745-776, 1974

GERSON, K.L.; HASLAM, R.H.A.:
Sub immunologic abnormalities in four boys with subacute sclerosing panencephalitis.
New Engl. J. Med. 285, 78-81, 1971

GLANZMANN, E.; RINICKER, P.:
Essentielle Lymphocytophthise. Ein neues Krankheitsbild aus der Säuglingspathologie.
Ann. Paediat. (Basel) 175: 1-32, 1950

GOOD, R.A.; RÖTSTEIN, J.; MAZZITELLO, W.F.:
Simultaneous occurrence of rheumatoid arthritis and agammaglobulinemia.
J. Lab. Clin. Med. 49: 343-357, 1957

GOOD, R.A.; DALMASSO, A.P.; MARTINEZ, C.; ARCHER, O.K.; PIERCE, J.C.; PAPERMASTER, B.W.:
The role of the thymus in development im immunologic capacity in rabbits and mice.
J. Exp. Med. 116, 773-735, 1962

GRANGER, G.A. and KOLB, W.P.:
Lymphocyte in vitro cytotoxicity: Mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target cell destruction.
J. Immunol. 101, 111-120, 1968

GRANGER, G.A.
LAWRENDE, S.H. and LANDY, M. (Editors)
Mediators of cellular immunity.
Academic Press, New York, pp. 324-338, 1969

HERSKOVIC, T.; WINAWER, S.J.; GOLDSMITH, R.; KLENN, R.; ZAMCHECK, N.:
Hypoproteinemia in intestinal lymphangiectasia.
Contribution of albumin "trapping" in the lymphedematous extremity.
Pediatrics 4o: 345-353, 1967

HITZIG, W.H.; BARANDUN, S.; COTTIER, H.:
Die Schweizer Form der Agammglobulinämie.
Ergeb. inn. Med. Kinderheilk. (N.F.) 27: 79-154, 1968

HITZIG, W.H.:
Congenital thymic and lymphocytic deficiency disorders.
In: Immunologic Disorders in Infants and Children.
Edited by E.R. STIEHM, V. FULGINITI
Saunders, pp. 215-272, 1973

HORTA-BARBOSA, L.; FUCILLO, D.A.; SEVER, J.L.; ZEMAN, W.:
Subacute sclerosing panencephalitis isolation of measles virus from brain biopsy.
Nature (London) 221: 974, 1969

KOLAR, O.:
Measles and subacute sclerosing panencephalitis.
Lancet ii: 1242, 1968

KRETH, H.W.; KAECKELL, Y.M.; MEVLEN, V.ter:
Cellular immunity in SSPE patients.
Med. Microbiol. Immunol. 16o: 191-199, 1974

LAWRENCE, S.H. and LANDY, M. (Editors)
Mediators of cellular immunity.
Academic Press, New York 1969

LISCHNER, H.W. and DiGEORGE, A.M.:
Role of the thymus in humoral immunity observation in complete or partial congenital absence of the thymus.
Lancet ii: 1o44-1o48 , 1969

LISCHNER, H.W. and HUFF, D.S.:
T-Cell deficiency in DiGeorge-Syndrome.
In Birth Defects: Orig. Art. Ser. XI, 1: 16-21, 1975

LOUIS-BAR, D.:
Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjunctivales symétriques, à disposition naevoide et des troubles cérébelleux.
Conf. neurol. (Basel) 4: 32-42, 1941

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F.:
Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.
Immunochemistry 2: 235-254 , 1965

MISTILIS, L.P.; SKYRING, A.P.; STEPHE, D.C.:
Intestinal lymphangiectasia: Mechanism of entric loss of plasma, protein and fat.
Lancet i: 77-79, 1965

MEULEN, V.ter.; KATZ, M.; MÜLLER, D.:
Subacute sclerosing panencephalitis.
Curr. Trop. Microbiol. Immunol. 57: 1-38, 1972

NOWELL, P.C.:
Phytohemagglutinin: A inhibitor of mitosis in cultures of normal human leukocytes.
Cancer Res. 2o: 462-466, 196o

OPPENHEIM, J.J.; BARLOW, M.; WALDMANN, T.A.; BLOCK, J.B.:
Impaired in vitro lymphocyte transformation in patients with Ataxia Teleangiectasia.
Brit. med. J. 2: 33o-333 , 1966

OPPENHEIM, J.J.; BLAESE, R.M.; WALDMANN, T.A.:
Defective lymphocyte transformation and delayed hypersensivity in Wiskott-Aldrich-Syndrome.
J. Immunol. 1o1: 835-844, 197o

OPPENHEIM, J.J.; BLEASE, R.M.; HORTON, J.E.; THOR, D.E.; GRANGER, G.A.:
Production of macrophage migration inhibitory factor and lymphotoxin by leukocytes from normal and Wiskott-Aldrich-Syndrome patients.
Cell. Immunol. 8: 62-7o, 1973

PETERSON, R.D.A.; KELLY, W.D.; GOOD, R.A.:
Ataxia teleangiectasia: Its association with defective thymus, immunologic deficiency disease and malignancy.
Lancet i: 1189-1193 , 1964

PETERSON, R.D.A.; COOPER, M.D.; GOOD, R.A.:
Lymphoid tissue abnormalities associated with Ataxia teleangiectasia.
Am. J. Med. 41: 342-359 , 1966

PICK, E.; TURK, J.L.:
The biological activities of soluble lymphocyte products.
Clin. Exp. Immunol. 1o: 1-23 , 1972

ROSEN, F.S.:
The thymus gland and the immune deficiency syndromes.
In: Immunological Diseases.
Edited by M. SATER
Little, Brown and Company, Boston, pp. 497-519, 1971

ROSEN, F.S.:
Immunological Deficiency Disease
In: Clinical Immunobiology.
Edited by BACH, F.H. and GOOD, R.A.
Academic Press, New York, Vol. 1, 271-289,1972

RUDDLE, N.H. and WAKSMAN, B.H.:
Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensivity.
III Analysis of mechanism.
J. Exp. Med. 128: 1267-128o, 1968

SHERWOOD, A.; BLAESE, R.M.:
Phytohemagglutinin-induced cytotoxic effector lymphocyte function in patients with Wiskott-Aldrich-Syndrome.
Clin. Exp. Immunol. 13: 515-52o, 1973

STIEHM, E.R. and FULGINITI, V.A.:
Immunologic disorders in infants and children.
Saunders

STROBER, W.; WOCHNER, R.D.; CARBONE, P.P.; WALDMANN, T.A.:
Intestinal lymphoangiectasia: a protein-losing enteropathy with hypogammaglobulinemia, lymphocytopenia and impaired homograft rejection.
J. Clin. Invest. 46: 1643-1656 , 1967

STROBER, W., WOCHNER, R.D.; BARLOW, M.H.; McFARLIN, D.E.; WALDMANN, T.A.:
Immunoglobulin metabolism in ataxia teleangiectasia.
J. Clin. Invest. 47: 1905-1915, 1968

TOBLER, R.; COTTIER, H.:
Familiäre Lymphopenie mit Agammaglobulinämie und schwerer Moniliasis: die "essentielle" Agammaglobulinämie.
Helv. Paediat. Acta 13: 313-338, 1958

TOMASI, T.B.
Human immunoglobulin A.
New Engl. J. Med. 279: 1327-1330, 1968

WALDMANN, T.A.; STEINFELD, J.L.; DUTCHER, F.F.; DAVIDSON, J.D.; GORDON, R.S.:
The role of the gastrointestinal system in idiopathic hypoproteinemia.
Gastroenterology 41: 197-207, 1961

WALDMANN, T.A.; STROBER, W.; BLAESE, R.M.; TERRY, W.D.:
Immunoglobulin metabolism in disease.
In: Immundeficiency in Man and Animals.
Edited by D. BERGSMA
Birth Defects: Orig. Art. Ser. XI, 1: 87-94 , 1975

WEBSTER, A.D.B.:
Immunodeficiency.
In: Immunology in Medicine.
Edited by E.J. HOLBOROW and W.G. REEVES
Academic Press, London, pp. 473-537, 1977

WEIDEN, P.L.; BLAESE, R.M.; STROBER, W.; BLOCK, J.B.; WALDMANN, T.A.:
Impaired lymphocyte transformation in intestinal lymphoangiectasia: evidence of at least two functionally distinct lymphocyte populations in man.
J. Clin. Invest. 51: 1319-1325, 1972

WILKINSON, P.; PINTO, B.; SENIOR, J.R.:
Reversible protein losing enteropathy with intestinal lymphangiectasia secondary to chronic constructive pericarditis.
New Engl. J. Med. 273: 1178-1181, 1965

WISKOTT, A.:
Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii?
Mschr. Kinderheilk. 68: 212-216, 1937

Die Untersuchungen wurden gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 37, B 7).

Herrn Dr. med. Eife danke ich dafür, daß er mir das Thema überlassen hat und mich beim experimentellen und schriftlichen Teil der Arbeit immer verständnisvoll unterstützt und beraten hat.

Herrn Dr. med. Belohradsky danke ich für die Unterstützung bei Untersuchungen der von ihm betreuten Patienten, insbesondere für das Überlassen der klinischen Daten seiner Wiskott-Aldrich-Patienten.

Mein besonderer Dank gilt Frau de Tavera für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden und die jederzeit hilfsbereite Zusammenarbeit.

Ferner gilt mein Dank den Damen des Fotolabor Frau Feder und Frau Hüttel.

LEBENSLAUF

Angelika Enders, geboren am 21. 8. 1951 in München

Vater: Karl Enders, geboren am 11. 3. 1918
Mutter: Johanna Enders, geb. Heimberg, geboren am 2. 6. 192o
verstorben am 7. 7. 1967

1958 - 1962	Volksschule in München
1962 - 1971	Städt. Luisengymnasium München
1971	Abitur
1971 - 1978	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1972	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1974	Ärztliche Vorprüfung
1975	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (AO)
1977	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (AO)
1977 - 1978	Praktisches Jahr
	Innere Medizin Städt. Krankenhaus Landshut
	Chirurgie Städt. Krankenhaus Landshut
	Pädiatrie Univ. Kinderklinik München
1978	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (AO)
seit 1978	wissenschaftliche Angestellte an der Kinderklinik der Universität München